

REMARKS

The Applicants thank the Examiner for the examination to date and for allowing claims 24, 27, 29, 31, 33, and 38. The Applicants respectfully request reconsideration of the present application in view of the foregoing amendments and the reasons that follow.

I. Information Disclosure Statement

The Applicants submit herewith courtesy copies of documents cited as Documents A10-A14 in an Information Disclosure Statement already submitted to the Office on May 10, 2006, which have not been initialed and considered. The listed documents were cited in the corresponding International Search Report in the present national stage application.

The Applicants respectfully request that each listed document be considered by the Office and be made of record in the present application and further respectfully request that an initialed copy of Form PTO/SB/08 as filed on May 10, 2006, be returned in accordance with MPEP § 609.

II. Status of the Claims and Claim Objections

Claim 25 is amended to depend on allowed claim 24 and to further recite specific embodiments thereof relating to the replacement of amino acids with cysteine. Support therefor can be found in Example 8, further referencing Figure 22 and Example 4, in the present Specification. Claim 27 is amended for a minor editorial change. Merely to provide clarity, claim 43 is cancelled and rewritten as claims 44 and 45, which respectively depend on claims 40 and 41 and recite the embodiments provided from previous claim 43. Accordingly, the Applicants respectfully submit that no new search is needed for claims 44 and 45. The claims not yet found allowable (claims 23, 26, 28, 30, 32, 39, and 42) and not elected claims 34-37 are cancelled merely to advance the prosecution of the application towards allowance. The Applicants reserve the right to pursue the subject matter of the cancelled claims in a continuation/divisional application. No new matter is introduced, and claims 24-25, 27, 29, 31, 33, 38, 40-41, and 44-45 are currently pending to be examined on their merits.

At least in view of the foregoing, the Applicants respectfully submit that the objections to claims 26-27 and 43 are moot.

III. Claim Rejections – 35 U.S.C. § 112

Claims 23, 25, 26, 28, 30, 32, and 39 are rejected under 35 U.S.C. § 112, ¶1, as allegedly containing new matter. Claims 39-43 are rejected under 35 U.S.C. § 112, ¶1, as allegedly not being enabled by the present Specification. The Applicants respectfully traverse these rejections.

(i) Present claims contain no new matter

At the outset, merely to advance the prosecution of the present application towards allowance, the Applicants cancel claims 23, 26, 28, 30, 32, and 39. Thus, the Applicants respectfully submit that the rejections related to these claims are moot.

With respect to claim 25, the Applicants hereby amend the claim to depend on allowed claim 24 and to further recite specific embodiments thereof with respect to the amino acid replacements. These amino acid replacements/exchanges and the corresponding antibodies with an additional S-S bond are described in Example 8, which further references Example 4, and Figure 22 in the present Specification. The aforementioned disclosure also indicates that all the other amino acids remain the same as in SEQ ID NOs: 99 and 106. Thus, while the Applicants have cancelled claims 34-37 to advance the present Application towards allowance, the Applicants respectfully traverse the Office's assertion that "VH FR1(aa 1-30 of SEQ ID NO: 99) can not be found in SEQ ID NO: 90 or 92." Office Action, p. 2. In any event, in view of the foregoing, the Applicants respectfully submit that claim 25 is also patentable.

(ii) Present claims are fully enabled

The Applicants respectfully traverse the Office's assertion that one of ordinary skill in the art is not enabled to reach the presently claimed invention based on the present Specification. At the outset, claims 39 and 42 are cancelled only to advance the prosecution of the present

Application towards allowance, and, accordingly, the rejections related thereto are moot. With respect to claims 40-41 and 44-45, the Applicants respectfully traverse the Office's assertion that the present Specification does not reasonable provide enablement for the intended use of the therapeutic agent for the disorders recited in the claims. Office Action, p. 3.

At the outset, the Applicants point out that the "test of enablement is whether one reasonably skilled in the art could make or use the invention from the disclosures in the patent coupled with information known in the art without undue experimentation" (MPEP § 2164.01, citing *In re Wands*, 858 F.2d 731, 737). Furthermore, the test for whether or not the enablement requirement has been met involves determining whether or not practice of the invention as claimed involves "undue experimentation". It has long been settled that "the key word is 'undue', not 'experimentation'". *In re Angstadt*, 190 USPQ 214,219 (C.C.P.A. 1976). In the present case, the present application requires no undue experimentation.

The Applicants respectfully point out that in order to make a rejection, the Office has the initial burden to establish a reasonable basis to question the enablement provided for the claimed invention. *In re Wright*, 999 F.2d 1557, 1562, 27 USPQ2d 1510,1513 (Fed. Cir. 1993). The Office must provide a reasonable explanation as to why the scope of protection provided by a claim is not adequately enabled by the disclosure. According to MPEP § 2164.04, a specification disclosure which contains a teaching of the manner and process of making and using an invention in terms which correspond in scope to those used in describing and defining the subject matter sought to be patented must be taken as being in compliance with the enablement requirement of 35 U.S.C. § 112, ¶1, unless there is a reason to doubt the objective truth of the statements contained therein which must be relied on for enabling support. It has been further stated by the court that it is incumbent upon the Patent Office, whenever a rejection on this basis is made, to explain why it doubts the truth or accuracy of any statement in a supporting disclosure and to back up assertions of its own with acceptable evidence or reasoning which is inconsistent with the contested statement.

The Office alleges that the present working examples provide no results and the present Specification does not reasonably provide enablement for the intended use of the therapeutic agent for the disorders recited in the claims. Office Action, p. 3. The Applicants respectfully traverse and point out that according to MPEP § 2164.02, "when considering the factors relating to a determination of non-enablement, then the absence of working examples will not by itself render the invention non-enabled" (emphasis added).

In fact, contrary to the Office's assertion on p. 3 of the Office Action, one of ordinary skill in the art would be able to appreciate the biological significance of the MABL-2 results. The Applicants respectfully direct the Office's attention to Examples 6 and 9 of the present Specification, wherein the Examples describe the apoptosis effect of MABL-2 sc(Fv)2 upon cancer cell lines. This holds true for both MABL-1 and MABL-2 sc(Fv)2. Moreover, Example 7 shows a corresponding effect upon leukemia model animals. Since both antibodies show a comparable binding and apoptotic activity, one of ordinary skill in the art would readily appreciate that the results provided in Example 7 are applicable to MABL-2 sc(Fv)2. Accordingly, present claims 40, 41 and 44-45 are enabled by the present Specification.

Therefore, at least in view of the foregoing, the Applicants respectfully request that the rejections be withdrawn.

CONCLUSION


The Applicants believe that the present application is now in condition for allowance and respectfully request favorable reconsideration of the application.

The Office is invited to contact the undersigned by telephone if a telephone interview would advance the prosecution of the present application.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required regarding this application under 37 C.F.R. §§ 1.16-1.17, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 19-0741. If any extensions of time are needed for timely acceptance of papers submitted herewith, the Applicants hereby petition for such extension under 37 C.F.R. § 1.136 and authorize payment of any such extensions fees to Deposit Account No. 19-0741.

Respectfully submitted,

Date March 8, 2010

By 

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 672-5569
Facsimile: (202) 672-5399

Stephen B. Maebius
Attorney for the Applicants
Registration No. 35,264

A-10

CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN OF THE IL-2 RECEPTOR

Publication number: JP4502408 (T)

Publication date: 1992-05-07

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- International: C12N15/09; A61K39/395; A61P3/10; A61P19/02; A61P21/04; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; A61P37/06; C07K1/22; C07K14/435; C07K14/705; C07K14/715; C07K16/00; C07K16/08; C07K16/18; C07K16/24; C07K16/28; C07K16/46; C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N7/01; C12N15/00; C12P21/00; C12P21/08; A61K38/00; C12R1/91; C12N15/09; A61K39/395; A61P3/00; A61P19/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/08; C07K16/18; C07K16/46; C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N7/01; C12N15/00; C12P21/00; C12P21/08; A61K38/00; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; C07K15/06; C12N5/10; C12N15/13; C12P21/08; C12R1/91

- European: C07K16/08A16B; C07K16/08A16D; C07K16/24H; C07K16/28A; C07K16/28H; C07K16/28Z; C07K16/46B2B

Application number: JP19900503677T 19891228

Priority number(s): WO1989US05857 19891228; US19880290975 19881228; US19890310252 19890213

Also published as:

WO9007861 (A1)
YU248989 (A1)
PT92758 (B)
NZ231984 (A)
NO2009026 (I1)

more >>

Abstract not available for JP 4502408 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9007861 (A1)

Novel methods for designing humanized immunoglobulins having one or more complementary determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. Each humanized immunoglobulin chain may comprise about 3 or more amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three additional position criteria. When combined into an intact antibody, the humanized immunoglobulins of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen, such as a protein or other compound containing an epitope.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑫ 公表特許公報(A)

平4-502408

⑬ 公表 平成4年(1992)5月7日

⑭ Int. Cl.⁹
C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号
8214-4B
8717-4B
7236-4B審査請求 未請求
予備審査請求 有
C 12 N 15/00
5/00

部門(区分) 1(1)

A
B※

(全 16 頁)

⑮ 発明の名称 IL-2レセプターのp55 Tacタンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

⑯ 特 願 平2-503677

⑰ 出 願 平1(1989)12月28日

⑱ 翻訳文提出日 平3(1991)5月1日

⑲ 国際出願 PCT/US89/05857

⑳ 国際公開番号 WO90/07861

㉑ 国際公開日 平2(1990)7月26日

優先権主張 ㉒ 1988年12月28日 ㉓ 米国(US) ㉔ 290,975

⑳ 発 明 者 クイーン, カリー エル. アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, バロ アルト, オーク
クリーク ドライブ 1300㉑ 出 願 人 プロテイン デザイン ラブ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, バロ アルト, ポータ
ス, インコーポレイテッド - ドライブ 3181

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

㉓ 指 定 国 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CF(広域
特許), CG(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, ES(広域特
許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR,
LK, LU, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), N
O, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. p55 Tacタンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト様免疫グロブリンを含んで成る組成物。

2. 前記免疫グロブリンが2対の軽鎖/重鎖二量体を含んで成り、各鎖が可変領域と定常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。

3. ヒトインターロイキン-2(IL-2)レセプターへのヒトIL-2の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト様免疫グロブリンを含んで成る組成物。

4. 前記免疫グロブリンが約 10^{-6} M⁻¹またはそれより強いヒトインターロイキン-2(IL-2)への結合親和性を示す、請求項1に記載の組成物。

5. 前記免疫グロブリンが1つの免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。

6. ヒト様フレームワーク領域および天然には該フレームワークと関連がない1または複数の外来の相補性決定領域を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、前記免疫グロブリンがヒトインターロイキン-2レセプターに結合することができる組成物。

7. 前記免疫グロブリンがIgG、免疫グロブリンイソタイプである、請求項6に記載の組成物。

8. 成熟軽鎖および重鎖可変領域タンパク質配列が図3お

よび図4中の成熟タンパク質配列と実質的に相同である、請求項6に記載の組成物。

9. 2対の軽鎖/重鎖二量体を有し且つ少なくとも約 10^{-6} M⁻¹の親和力でヒトインターロイキン-2レセプター上のエピトープと特異的に反応することができるヒト様免疫グロブリンであって、前記軽鎖および重鎖が相補性決定領域(CDR)とヒト様フレームワーク領域を含んで成り、ここでCDRが該フレームワーク領域とは異なる免疫グロブリンからのものである、ヒト様免疫グロブリン。

10. ヒトインターロイキン-2(IL-2)レセプターへのインターロイキン-2(IL-2)の結合を阻止することができる、請求項9に記載の免疫グロブリン。

11. ヒトインターロイキン-2レセプターに結合することができるヒト化免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンはヒト様フレームワーク中に抗-Tac抗体からの1または複数の相補性決定領域(CDR)を含んで成り、ここで前記ヒト様フレームワーク領域は抗-Tac抗体から選択された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト化免疫グロブリン。

12. 図3に示されるような成熟重鎖可変配列、および図4に示されるような成熟軽鎖配列を有する、請求項11に記載のヒト化免疫グロブリン。

13. 抗-Tac抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト化免疫グロブリン。

14. ヒト患者においてT細胞介在性障害を処置する方法であって、前記患者に治療的有効量の請求項1に記載の免疫グ

ロブリンを投与することを含んで成る方法。

15. ミエローマまたはハイブリドーマ細胞中で生産された請求項1に記載の免疫グロブリン。

16. ヒト様免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列および1または複数のマウス免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、発現時に p55 Tacタンパク質と特異的に反応し且つヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプター (IL-2) へのIL-2の結合を阻止することができる免疫グロブリンをコードする前記ポリヌクレオチド分子。

17. 請求項16のポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた細胞系。

18. 供与体Igからの1または複数の相補性決定領域およびヒトIgからのフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリン鎖の設計方法であって、供与体Ig軽鎖または重鎖のフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒトIg鎖のコレクション中の対応する配列と比較し；そしてヒトIg軽鎖または重鎖のフレームワークを提供するためにコレクションからの約3つの最も相同性の配列のうちの1つを選択することを含んで成る方法。

19. ヒト受容体免疫グロブリンからのフレームワーク領域および抗原に結合することができる供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリン鎖の設計方法であって、下記のような免疫グロブリン中の位置において、受容体免疫グロブリンの少なくとも1つのヒトフ

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの対応するアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてまれであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において普通である；または

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内に側鎖原子を有しそして抗原とまたはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用することができると思われる。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン鎖が、CDRに加えて、基準(a)、(b)または(c)により選択された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つがCDRのすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18、19または20に従って設計されたヒト化免疫グロブリン。

明 細 書

IL-2レセプターの p55 Tacタンパク質に 特異的なキメラ免疫グロブリン

発明の分野

本発明は一般に、新規治療薬を開発するための組換えDNA技術とモノクローナル抗体技術の組合せに関し、更に詳しくは、非免疫原性抗体の製造およびそれらの利用に関する。

発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫応答が媒介される。それらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞サブセットを包含する。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初はT細胞増殖因子と命名されたインターロイキン-2 (IL-2) として知られるリンホカインの生産を通してである。IL-2の主な機能はT細胞の刺激と維持であると思われる。実際、或る免疫学者はIL-2が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている [Farrar, J.ら、*Immunol. Rev.* 63: 129-166 (1982) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる]。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2は特異的な高

親和性膜レセプターと相互作用する [Greene, W.ら、*Progress in Hematology XIV*, B. Brown編、Grune and Statton, New York (1986), 283~頁]。ヒトIL-2レセプターは複雑な多重鎖の糖タンパク質であり、1本の鎖は Tacペプチドとして知られる約55kDのサイズである [Leonard, W.ら、*J. Biol. Chem.* 260: 1872 (1985) 参照、これは参考として本明細書中に組み込まれる]。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む 272アミノ酸のペプチドを推定している [Leonard, W.ら、*Nature* 311: 626 (1984) 参照]。p55 Tacタンパク質のN-末端の219アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る [Leonard, W.ら、*Science* 230: 633-639 (1984) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる]。

ヒトIL-2レセプターの構造と機能の解明のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tacとして知られるマウスモノクローナル抗体 [Uchiyamaら、*J. Immunol.* 126: 1393 (1981)] は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単球-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出され得ることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または循環しているマクロファージは、典型的にはIL-2レセプターを提示しない [Herrmannら、*J. Exp. Med.* 162: 1111 (1985)]。

抗-Tacモノクローナル抗体は、IL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を明らかにするために用いられており、

そして細胞培養における細胞毒性およびサプレッサーTリンパ球の発生を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、様々な障害、特に成人T細胞白血病がT細胞による不適当なIL-2レセプター発現に関係づけられている。

より最近になって、IL-2レセプターはT細胞介在性疾患に対する新規治療アプローチの理想的な標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独または免疫複合体（例えばリシンA鎖、同位体等との免疫複合体）として用いて、IL-2レセプターを有する細胞を効果的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの薬剤は、理論上はIL-2レセプターを発現している白血病細胞、或る種のB細胞、または病気状態に関与する活性化されたT細胞を排除することができ、その上さらに必要とされる時には成熟正常T細胞およびそれらの前駆体の保持によって正常T細胞免疫応答を開始する能力を保証する。一般に、他のT細胞特異的薬剤の多くは本質的に全ての周辺のT細胞を破壊し得、このことは薬剤の治療効能を制限する。全体に、IL-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、器官移植および活性化されたT細胞による任意の望ましくない応答において療法的効用を有することができる。実際、例えば抗-Tac抗体を使って臨床試験が開始されている（一般に、Waldman, T.ら、Cancer Res. 45: 625 (1985)およびWaldman, T., Science 232: 727-732 (1986)を参照のこと；これらは参

は、一部は予想不可能な結合親和性のためである不確かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療製剤および他の用途に適当である形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト様免疫グロブリン、例えばヒトIL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト障害の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、IL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができそして/またはヒトIL-2レセプター上のp55 Tacタンパク質に結合することができるヒト様免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成る鎖を有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^8 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてヒトIL-2レセプターに結合することができるヒト様抗体を生産することができる。

結合性断片または他の誘導体を包含する免疫グロブリンは、様々な組換えDNA技術により、トランスフェクトされた細胞、好ましくは不死化された真核細胞、例えばミエロマま

考として本明細書中に組み込まれる]。

不運にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような繰り返し治療疾患において、幾つかの欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト補体を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能特性を欠く。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原性となるであろう実質的長さのアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入後、抗体に対して患者により惹起された免疫応答が非常に強力であり、最初の処置後の抗体の治療効用を本質的に排除しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処置するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性（ヒトに対して）モノクローナル抗体が開発されることが期待され得るので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一または第二の処置後、無関係の治療のためでさえもその後の処置が無効または危険になり得る。

いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）は幾らか好結果であることが判明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトIL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を使うことは非常に困難である。同様に、いわゆる「ヒト化された」抗体（例えばEPO公報No.0239400を参照のこと）を作製するために組換えDNA技術を使用すること

はハイブリドーマ細胞中での最大発現を使って生産することができる。ヒト様免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを結合することによって作製することができる。

ヒト様免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射性核種、リボソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において活性な細胞毒性物質と複合体化して、使用することができる。それらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される障害を処置することにおいて有用であろう。ヒト様免疫グロブリンまたはそれらの複合体は、投与の形式に依存するであろう医薬上許容される剤形において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または複数の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト様免疫グロブリン鎖を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相同性の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで成る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10-20の免疫グロブリン鎖配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相同性を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相同性を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重鎖または軽鎖（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を含有するだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常領域および別のタンパク質を含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を形成せしめることができる。

本発明の別の態様によれば、上記の比較段階と共にまたは別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリン鎖からのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定のには、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の更なる任意の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がその位置に稀であり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に普通である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内にあり、そしてヒト化免疫グロブリンの

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tacアミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac重鎖可変領域遺伝子のヌクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのヌクレオチドTCTAGAはXbaI部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸#20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac軽鎖可変領域遺伝子のヌクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がヌクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのヌクレオチドTCTAGAはXbaI部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸#21のDで始まる。

図5：A. ヒト化抗-Tac重鎖遺伝子を合成するのに用いた、5'から3'方向に記載した4つのオリゴヌクレオチドの配列。B. 前記オリゴヌクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴヌクレオチドの3'方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5'から3'方向に記載した4つのオリゴヌクレオチドの配列。(B) 前記オリゴヌクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴヌクレオチドの3'方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のHindIII部位の位置が示されている。

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリン鎖は、典型的には、CDRに加えて、供与体免疫グロブリンからの少なくとも約3アミノ酸を含んで成り、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に結合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエビトープを含むタンパク質または他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約 $10^6 M^{-1}$ 以上から様々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものと親和力の約4倍以内であろう。

図面の簡単な説明

図1：抗-Tac重鎖（上行）およびEu重鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tacアミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図2：抗-Tac軽鎖（上行）およびEu軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

図7：ヒト化抗-Tac重鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuGTAC1の略図。関係する制限部位が示されており、そして重鎖のコード領域が箱として表示されている。免疫グロブリン(Ig)プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。Eu=重鎖エンハンサー、Hyg=ヒグロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac軽鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuLTACの略図。関係する制限部位が示されており、そして軽鎖のコード領域が箱として表示されている。Igプロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac抗体またはヒト化抗-Tac抗体に次いで標識としてフルオレセイン接合ヤギ抗マウスIg抗体またはヤギ抗ヒトIg抗体でそれぞれ染色されたHut-102およびJurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点線曲線は第一抗体が削除された時の結果を示し、実線曲線は記載された第一および第二（接合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指摘されるような0~40ngの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコエリトリン接合アビジンで染色されたHut-102細胞のフルオロサイトメトリー。

(B) 指摘の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコエリトリン接合アビジンで染色されたHut-102細胞のフルオロサイトメトリー。

発明の詳細な記載

本発明の一態様によれば、所望のエピトープ、例えばヒト T 細胞上の IL-2 レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト様免疫グロブリンが提供される。それらの免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^6 M^{-1}$ 、好ましくは $10^8 M^{-1}$ ~ $10^{10} M^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒト IL-2 レセプターへの IL-2 の結合を阻止することができる。ヒト様免疫グロブリンは、ヒト様フレームワークを有し、そして p55 Tac タンパク質上のエピトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域 (CDR) を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、経済的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト患者における T 細胞介在性障害の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は 4 量体を含むことが知られている。各 4 量体は全く同じ 2 対のポリペプチド鎖から成り、各対は 1 本の「軽」(約 25kD) 鎖と 1 本の「重」(約 50-70kD) 鎖を有する。各鎖の NH₂-末端は、主に抗原認識を担う約 100 ~ 110 またはそれ以上のアミノ酸の変換領域で始まる。各鎖の COOH-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域を限定する。

軽鎖は κ または λ のいずれかとして分類される。重鎖は γ 、 μ 、 α 、 δ または ϵ として分類 (および細分類) され、そしてそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgD および IgE として抗体のイソタイプを限定する。軽鎖および重鎖中の可変および定常領域

細書中に組み込まれる)。[一般に、Hood ら、"Immunology", Benjamin, N.Y., 第 2 版 (1984); 並びに Hunkapiller および Hood, *Nature*, 323: 15-16 (1986) を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。]

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変 (V) セグメントをヒト定常 (C) セグメント、例えば γ 、および μ に結合することができる。典型的な製法用キメラ抗体はマウス抗体からの V または抗原結合領域とヒト抗体からの C またはエフェクター領域とから成るハイブリッドタンパク質である (例えば、A. T. C. 登録番号 CRL 9688 は抗-Tac キメラ抗体を分泌する) が、他の哺乳動物種を使用することもできる。

本明細書中で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabat ら、前掲により定義されたように、単一種において異なる免疫グロブリン間で比較的保存される免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の部分について呼称する。本明細書中で使用する「ヒト様フレームワーク領域」なる用語は、各々存在する鎖においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約 70 またはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には 75 ~ 85 またはそれ以上のアミノ酸残基を含んで成るフレームワーク領域である。

本明細書中で使用する「ヒト様免疫グロブリン」なる用語は、ヒト様フレームワーク領域を含んで成る免疫グロブリン

は、約 12 またはそれより多数のアミノ酸の "J" 領域により連結され、重鎖は約 12 またはそれより多数のアミノ酸の "D" 領域も含む [一般に、Fundamental Immunology, Paul, W. 編、第 7 章、第 131-166 頁、Raven Press, N.Y. (1984) を参照のこと; これは参考として本明細書中に組み込まれる]。

各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗原結合部位を形成する。鎖は全て、3 つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す ["Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, B. ら、U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 並びに Chothia および Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987) を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる]。各対の二本鎖からの CDR は、フレームワーク領域によって整列され、特異的なエピトープへの結合を可能にする。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる 1 または複数のポリペプチドから成るタンパク質について呼称する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ および μ 定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fv、Fab および F(ab)₂、並びに一本鎖を包含する (例えば、Huston ら、*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988) および Bird ら、*Science*, 242: 423-426 (1988)。これらは参考として本明

について言及し、この場合、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約 85 ~ 90%、好ましくは約 95% が同一である。よって、おそらく CDR を除くヒト様免疫グロブリンの全ての部分が、1 または複数の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に相同である。例えば、ヒト様免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト定常領域キメラ抗体を包含しないだろう。本発明の別の一般的観点によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を増加させるために、ヒト様またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の限定された数のアミノ酸が受容体 Ig よりもむしろ供与体 Ig 中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基準も含まれる。

本発明のこの観点は、(例として CDR の入手源としてマウス抗体を使って) ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の 2 つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく:

(1) マウス CDR をヒトフレームワークと結合する時、CDR に密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかに CDR を歪め、そして歪められた CDR は供与抗体中の CDR が行うのと同じくらい効果的な抗原との接触を行うことができないと考える;

(2) また、CDRに密接しているがその一部ではない(即ちまだフレームワークの一部である)元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の原因である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

それらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。それらの基準を単独でまたは必要な時は組み合わせて使用し、所望の親和力または他の特徴を獲得することができる。

基準Ⅰ：受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相同である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体からの共通のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク(例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource)中のヒト重鎖(軽鎖)可変領域に対するマウス重鎖(軽鎖)可変領域の配列の比較は、異なるヒト領域に対する相同性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖(それぞれ軽鎖)に最も相同であるヒト重鎖(それぞれ軽鎖)の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成るヒト化抗体の正

確な全形状が供与抗体の形状と非常によく似ており、CDRを垂める見込みを減らすことができる。

典型的には、重鎖フレームワークを提供するために、少なくとも約10-20の別個のヒト重鎖の代表的コレクションの中の3-5の最も相同な重鎖可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、軽鎖についても同様にして選択されるだろう。好ましくは、1-3の最も相同な領域のうちの1つが使用されるだろう。選択された受容体免疫グロブリン鎖は、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好ましくは少なくとも約65%の相同性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好ましくは、それらの基準の1つを満足するほとんどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されるだろう。

基準Ⅱ：ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない(即ち「まれである」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト重鎖(それぞれ軽鎖)V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す)場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である(即ち「普通である」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す)場

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をたまたまヒト抗体に典型的である供与抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にすることができる。

基準Ⅲ：ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し(Amitら、*Science*, 233, 747-753 (1986)、これは参考として本明細書中に組み込まれる)、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する全ての抗原接触を維持するのに望ましいかもしれない。

基準Ⅳ：典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の幾つかのアミノ酸がCDRに密接しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、疎水の相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の或る部位の約3Å単位内に側鎖原子を有し、そして確立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従ってCDR原子と相互作用するこ

とができるような原子を含まなければならない。抗体などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータープログラムが一般に利用可能であり、そして当業者に周知である

(Loewら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, 15: 55-66 (1988); Brucoleriら、*Science*, 233: 755-758 (1986)を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる)。それらは本発明の部分を構成しない。実際、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能である既知の抗体を必要であれば別の抗体の荒モデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータープログラムを用いてコンピューター画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして種々のアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト療法において使用されるマウス抗体または或る場合にはキメラ抗体を上回る少なくとも3つの潜在的利点を有する：

1) エフェクター部分がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分と良好に反応することができる(例えば、補体依存性細胞障害作用(CDC)または抗体依存性細胞障害作用(ADCC)により、より効果的に標的細胞を破壊する)。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を認識しないであろう。従ってそのような注入抗体に対する抗体応答は全体的に外来のマウス抗体または部分的に外来のキメラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 注入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも

ずっと短いヒト循環中の半減期を有することが報告されている [D. Shawら, *J. Immunol.*, 138: 4534-4538 (1987)]。注入されたヒト化抗体は、おそらく天然のヒト抗体により類似した半減期を有し、より少量または少頻度の用量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No 0239400に記載されたものに関して改善されたヒト化免疫グロブリン (例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる) に特に向けられる。その出願明細書 (その開示は本発明の範囲から除去される) は、或る種の免疫グロブリンについて、受容体抗体の軽鎖または重鎖可変領域中のCDR領域を異なる特異性の抗体からのCDRの類似部分 (典型的には溶媒の影響を受けやすい部分) で置換することを記載している。また、その出願明細書は、或る種の免疫グロブリンについて、抗原結合部位から (溶媒に) 影響されやすい残基を単に移動する可能性を記載しており、この残基は明らかに幾つかのフレームワーク領域を含むことができる [特に、Amitら, *Science*, 233: 747-753 (1986)] に記載されたような抗原結合に関与することが既知である残基、またはおそらく鎖間相互作用に必須である残基—ただしそれらの選択については該出願明細書において不十分な指針しか与えられていない]。例えば、本発明の好ましい態様は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ (または好ましくは各々) のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することを伴う。一般に、例えばコンホメーション (および普通はそれらの抗原結合特異性) を維持するためにCDRと連絡をとる

鎖/重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の取得および精製を行うことができる。

ヒト定常領域DNA配列は、周知の方法に従って、種々のヒト細胞から、好ましくは不死化されたB細胞から単離することができる (Kabat、前掲およびWP 87/02671を参照のこと)。例えば、ヒトκ免疫グロブリン定常およびJ領域遺伝子および配列はHeiterら、*Cell* 22: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC γ 遺伝子のヌクレオチド配列はElisonら、*Nucl. Acid Res.* 10: 4071 (1982)中に記載されている (その両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。本発明の免疫グロブリンを作製するためのCDRは、所望の抗原 (例えばヒトIL-2レセプター) に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして誘導され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。DNA配列の適当な起源細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる ["Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる]。

本明細書中に特定の記載のヒト様免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同の」変更免疫グロブリンを容易に設計することができ、そして当業者に周知の様々な組換えDN

任意のフレームワーク残基が、上記に詳細に記載された本発明の好ましい態様の範囲内に特に含まれる。

1つの観点において、本発明は、所望のエピトープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエピトープ、に結合することができる免疫グロブリン (例えば抗-Tacモノクローナル抗体) からの重鎖および/または軽鎖CDR (典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する) をコードする組換えDNAセグメントに向けられる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒト様フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖超可変領域 (ヒト様フレームワーク領域と共に) を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好ましいDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン縮重および重要でないアミノ酸置換のため、後述するようにそれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト様抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれば、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、軽

A技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は幾つかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト様免疫グロブリンを基準として、種々の異なるヒトフレームワーク領域を単独または組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の修飾は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異誘発 [GillmanおよびSmith, *Gene* 8: 81-97 (1979) 並びに Robertsら, *Nature* 328: 731-734 (1987)を参照のこと; この両者は参考として本明細書中に組み込まれる] により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一部分のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫グロブリン活性 (例えば補体結合活性) を有する。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの機能性領域 (例えば酵素; 1987年12月15日提出の一般譲渡されたU.S.S.N. 132,387を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる) と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質 (例えば免疫毒素) を製造することができる。

最終的に所望のヒト様抗体を発現することができる本発明の核酸配列は、様々な異なるポリヌクレオチド (ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等) および成分 (例えばV、J、DおよびC領域) から、そして様々な異

なる技術により、形成せしめることができる。適当なゲノム配列を連結することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい〔ヨーロッパ特許公報No 0239400およびReichman, L.ら, *Nature* 332: 323-327 (1987)を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる〕。

前に述べたように、該DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した(即ち、機能を保証するように配置させた)後で該配列が宿主中で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソードとしてまたは宿主染色体DNAの組込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むだろう(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

大腸菌(*E. coli*)は本発明のDNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バシラス菌、例えばバシラス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、並びに他の腸内細菌、例えばサルモネラ菌(*Salmonella*)、セラチア菌(*Serratia*)および種々のシュードモナス菌(*Pseudomonas*)種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列(例えば複製開始点)を含むであろう発現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リプトファン(*trp*)プロモーター系、 β -ラクタマーゼプロモーター系、または λ ファージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位等を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。サッカロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、適当なベクターは、発現調節配列、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを包含するプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結配列等を有する。

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる

[Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる]。完全な免疫グロブリンを分泌することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際は真核細胞が好ましい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、ミエロマ細胞系等が挙げられるが、好ましくは形質転換されたB細胞またはハイブリドマである。それらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー[Queen, C.ら, *Immunol. Rev.* 89: 49-68 (1986)；これは参考として本明細書中に組み込まれ

る]、および必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、エンハンサーを有するSV40 [MulliganおよびBerg, *Science* 209: 1422-1427 (1980)を参照のこと]、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス等に由来するプロモーターである。

着目のDNAセグメント(例えば、重鎖および軽鎖コード配列並びに発現調節配列)を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用され得る[一般には、Maniatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる]。

一度発現されれば、本発明の完全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当業界の標準法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等によって精製することができる[一般的には、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)を参照のこと]。少なくとも約90~95%均質の實質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98~99%またはそれ以上の均質が医薬用途に好ましい。部分的にまたは所望の時には均質まで精製

されれば、療法的に(体外的を含む)またはアッセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実施する際に該ポリペプチドを使用することができる[一般的には、*Immunological Methods*, 第IおよびII巻, LefkovitsおよびPernis編, Academic Press, New York, N. Y. (1979および1981)を参照のこと]。

本発明において例示されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病気状態を処置することにおいて個々に用いられるだろう。通常、病気に関連する細胞がIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるヒト様抗体が適当である("Treating Human Malignancies and Disorders"と題するU.S.S.N. 085,707を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。例えば、処置に適する典型的な病気状態として、器官移植、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病気としては、自己免疫疾患、例えばI型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡および重症筋無力症が挙げられる。

本発明のヒト様抗体は、別の抗体、特に病気の一因となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), *Leukocyte Typing*, Bernardら編, Springer-Verlag, N. Y.

(1984) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) により命名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを挙げるができる。

該抗体は、化学療法剤または免疫抑制剤と共に与えられる別々に投与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスポリンAまたはプリン類似体 (例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン等) が挙げられるだろうが、当業者に周知である多数の他の薬剤 (例えばシクロホスファミド、ブレドニソン等) も使用することができる。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫毒素における当該抗体の使用を含んで成る。免疫毒素は2つの成分により特徴づけられ、そして試験管内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー賦形剤」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は様々な周知の化学的方法のいずれかによって一緒に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫毒素の製造が当業界で周知であり、例えば "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bul-

let", Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 168-190 (1982) 中找到することができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

様々な細胞毒性物質が免疫毒素における使用に相当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212; 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキセート、アドリアマイシンおよびシスプラチン; 並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質様アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュドモノナス外毒素A、リシン、ジフテリア毒素、リシンA類等; または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素 (例えばホスホリパーゼC) を挙げることができる。[1988年12月28日に提出された一般譲渡されたU.S.S.N. 07/290,968; "Chimeric Toxins", OlsnesおよびPhil, Pharmac. Ther., 25: 355-381 (1982); 並びに "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", BaldwinおよびByers 編, 159-179, 224-266 頁, Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。]

免疫毒素のデリバリー成分は、本発明のヒト様免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えば Fabが使用される。典型的には、免疫毒素中の抗体はヒト IgMまたはIgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物正常領域を用いることもできる。

本発明のヒト様抗体およびその医薬組成物は、特に非経口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。非経口投与用組成物は、通常、許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された抗体の溶液または混合物を含んで成るだろう。様々な水性担体、例えば水、緩衝化された水、0.4% 食塩水、0.3% グリシン等を使用することができる。それらの溶液は無菌であり、通常は粒状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件に必要である時は医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有することができる。それらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に渡り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5%未満から、通常は少なくとも約1%から、15-20重量%ほどまでに及ぶことができ、そして液体の体積、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1 mlの無菌緩衝液と50mgの抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガー液と150mgの抗体を含むように調製することができる。非経口投与可能な組成物の実際の調製方法は当業者に周知であるかまたは明白であり、そして例えばRemington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は貯蔵のために凍結乾燥することができ、そして使用前に適当な担体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で既知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は様々な程度の抗体活性の低下をもたらし得ること (例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト様抗体またはその混合物を含有する組成物は、予防および/または治療処置のために投与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療の有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の重度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1~約200mgの抗体、より好ましくは患者あたり5~25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状状態、即ち命にかかわるかまたはもしかすると命にかかわる状況において使用されるだろうことを念頭に置かなければならない。そのような場合、本発明のヒト様抗体により達成される外来性物質の最小化および「外来物質」拒絶の低確率の点からみて、実質的過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療医に

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本発明の抗体またはその混合物を含有する組成物は、患者の抵抗性を高めるためにまだ病状状態でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の健康状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1~25mg、特に患者あたり0.5~2.5mgであろう。好ましい予防用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

本発明のヒト様抗体は、更に試験管内において広範な用途を見出すことができる。一例として、T細胞の型決定、特異的IL-2レセプターを有する細胞または膜レセプターの断片の単離、ワクチンの調製等に模範的な抗体を利用することができる。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト様抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または選択された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、単独

でまたは所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、普通は1つの容器に凍結乾燥形態で提供することができる。抗体は標識もしくは毒素と接合されていても未接合であってもよく、緩衝液、例えばTris、リン酸塩、炭酸塩等の緩衝液、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用説明書のセットと共にキット中に含まれる。一般にそれらの材料は活性抗体の量を基にして約5重量%未満、通常は抗体濃度を基にして少なくとも約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性増量剤または賦形剤を含めることが望ましく、この場合賦形剤は全組成の約1~99重量%で存在することができる。キメラ抗体を結合することができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には標識と接合され、上述の抗体製剤と同様にして製剤化される。

次の実施例は例示の目的で与えられ、限定のためではない。

実 験

ヒト様軽鎖および重鎖遺伝子の設計

ヒト化抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体Euの配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, B.ら、U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Tacの重鎖のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource中の他のいずれの重鎖配列よりもこの抗体

の重鎖に相同性が高かったためである。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Tac重鎖配列（一般譲渡されたU.S.S.N.の186,862と223,037を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる）をEu重鎖配列と整列した（図1）。各位置において、その位置が次のカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、Euアミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Tacアミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような相補性決定領域(CDR)中にある（アミノ酸31-35、50-66、99-106）；

(2) その位置ではEuアミノ酸がヒト重鎖配列にまれであり、一方抗-Tacアミノ酸がその位置でヒト重鎖配列に典型的であった（アミノ酸27、93、95、98、107-109、111）；

(3) その位置が抗-Tac重鎖のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった（アミノ酸30と67）；

(4) 抗-Tac抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に密接していることを示唆した（アミノ酸48と68）。

幾つかのアミノ酸はそれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ挙げられている。

ヒト化軽鎖の配列を選択するために、抗-Tac軽鎖配列をEu軽鎖の配列と整列させた（図2）。その位置が同じくカテゴリー(1)~(4)のうちの1つに入らない限り、Euアミノ酸を各位置において選択した（カテゴリー定義中の重

鎖を軽鎖で置き換える）：

(1) CDR（アミノ酸24-34、50-56、89-97）。

(2) Euよりも抗-Tacアミノ酸がより典型的である（アミノ酸48と63）。

(3) CDRに近い（アミノ酸なし；Euと抗-Tacはそれらの位置全てにおいて既に同じであった）。

(4) 結合領域に3次元的に近接している可能性（アミノ酸60）。

重鎖（図3）と軽鎖（図4）の実際のヌクレオチド配列は次のようにして選択した。

(1) 該ヌクレオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。

(2) それらのコード配列の5'側のヌクレオチド配列はリーダー（シグナル）配列、即ちMOPC 63抗体の軽鎖のリーダーおよびPCH 108A抗体の重鎖のリーダー（Kabatら、前掲）をコードする。それらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。

(3) コード配列の3'側のヌクレオチド配列は、抗-Tac配列の一部であるマウス軽鎖J5セグメントおよびマウス重鎖J5セグメントに従う配列である。それらの配列はスプライス供与配列を含有するために含まれる。

(4) 配列の各末端には、Xba I部位での切断およびベクターのXba I部位へのクローニングを可能にするためのXba I部位が存在する。

ヒト化軽鎖および重鎖遺伝子の作製

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA合成装置を使って4つのオリゴヌクレオチド HES12, HES13, HES14, HES15 (図5A) を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、重鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図5B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、Xba I 部位での切断を可能にするために各末端に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化重鎖をカバーする。該オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴヌクレオチドを、標準手順 (Maniatis, 前掲を参照のこと) によりATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約3.75 μ Mの濃度において40 μ MのTA (33mM Tris酢酸塩, pH7.9, 66mM酢酸カリウム, 10mM酢酸マグネシウム) 中に一緒に懸濁し、4分間95℃に加熱し、そして4℃にゆっくり冷却した。各オリゴヌクレオチドの反対鎖を合成することにより該オリゴヌクレオチドから完全な遺伝子を合成するために (図5B)、次の成分を100 μ Lの最終容量において添加した:

- 10 μ L アニールしたオリゴヌクレオチド
- 各0.16mM デオキシリボヌクレオチド
- 0.5 mM ATP
- 0.5 mM DTT

ヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

軽鎖遺伝子はそれらのオリゴヌクレオチドから2部分において合成した。JFD1とJFD2各々0.5 μ Mを20 μ Lのシークエナーゼ緩衝液 (40mM Tris-HCl, pH7.5, 20mM塩化マグネシウム, 50mM塩化ナトリウム) 中に混合し、70℃に3分間加熱し、そして該オリゴヌクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと23℃まで放冷した。JFD3とJFD4も同様にして処理した。各反応液をDTT 10mMおよび各デオキシヌクレオチド0.5mMにし、6.5 μ Lのシークエナーゼ (US Biochemicals) を最終容量24 μ Lにおいて添加し、そして37℃で1時間インキュベートして該ヌクレオチドの反応方向鎖を合成した。各反応液にXba I とHind IIIを添加してDNAを消化した (JFD2とJFD3がオーバーラップする領域の中、従って合成されたDNAの各々の中にHind III部位が存在する; 図6B)。反応液をポリアクリルアミドゲル上で泳動し、Xba I-Hind III断片を精製し、そして標準法によりpUC18中にクローニングした。各断片について数個のプラスミド単離物をジデオキシ法により配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化軽鎖および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製

重鎖 Xba I 断片が挿入されている pUC19 プラスミドから該断片を単離し、そして標準法により正しい方向においてベクターpV α 1 (一般に譲渡されたU.S.S.N. 223,037 を参照のこと) の Xba I 部位に挿入し、プラスミドpHuGTAC1 (図7) を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの完全重鎖を発現するだろう。

100 μ M/ml BSA

3.5 μ M/ml T4 g43タンパク質 (DNAポリメラーゼ)

25 μ M/ml T4 g44/62タンパク質
(ポリメラーゼ補助タンパク質)

25 μ M/ml 45タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を37℃で30分間インキュベートした。次いで10 μ LのT4 DNAリガーゼを添加し、そして37℃で30分間インキュベートした。70℃で15分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとリガーゼを不活性化した。遺伝子をXba I で消化するために、反応液に200 μ M/mlのBSAと1mMのDTTを含む50 μ Lの2 \times TA、43 μ Lの水、および5 μ L中の50 μ LのXba I を添加した。反応液を37℃で3時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから431bpのXba I断片を精製し、そして標準法によりプラスミドpUC19のXba I部位中にクローニングした。4つのプラスミド単離物を精製し、ジデオキシ法を使って配列決定した。そのうちの1つが正しい配列を有した (図3)。

軽鎖を合成するために、4つのオリゴヌクレオチドJFD1, JFD2, JFD3, JFD4 (図6A) を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、軽鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図6B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、Xba I 部位での切断を可能にするために各末端に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2つの軽鎖 Xba I-Hind III断片が挿入されている各pUC18プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクタープラスミドpV α 1 (一般に譲渡されたU.S.S.N. 223,037 を参照のこと) をXba I で切断し、標準法により脱リン酸しそして2断片を連結せしめた。所望の反応生成物は次のような場形態を有する: ベクター-Xba I断片1-Hind III断片2-Xba I-ベクター。数個のプラスミド単離物を制限マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する1つのプラスミドを選択した。このプラスミドpHuLTAC (図8) は完全なヒト化軽鎖 (図4) を含有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの軽鎖を発現するだろう。

ヒト化抗体の合成および親和力

プラスミドpHuGTAC1およびpHuLTACをマウスSp2/0細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上のgptおよびhyg遺伝子 (図7・8) により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロマイシンBに対する耐性に基づいて標準法により選択した。それらの細胞がIL-2レセプターに結合する抗体を分泌したことを確かめるために、細胞からの上清をIL-2レセプターを発現することが知られているHUT-102細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセイン接合ヤギ抗ヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そしてPACSCANサイトフルオロメーター上で蛍光について分析した。結果 (図9A) は、ヒト化抗体がそれらの細胞には結合するが、IL-2レセプターを発現しないJurkat T細胞には結合しない

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B、C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生産する細胞をマウスに注入し、そして生じた腹水を回収した。標準法に従って Affigel-10支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA)上に調製されたヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体のアフィニティークラムに通過させることにより、腹水からヒト化抗体を実質上均質まで精製した。もとの抗-Tac抗体と比較してヒト化抗体の親和力を測定するために、競合的結合実験を行った。約 5×10^5 個のHUT-102細胞を既知量(10-40ng)の抗-Tac抗体とヒト化抗-Tac抗体と共に4℃で10分間インキュベートした。次いで細胞に100ngのビオチン化抗-Tacを添加し、そして4℃で30分間インキュベートした。この量の抗-Tacは細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1%アジ化ナトリウムを含む2mlのリン酸塩緩衝化塩溶液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで250ngのフィコエリトリン接合アビジンと共に細胞を4℃で30分間インキュベートし、この接合アビジンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tacに結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で固定し、そしてFACSCANサイトフルオロメーター上で蛍光分析した。

第一段階における競合体としての抗-Tac抗体の使用量を増加していくと(10-40ng)、第二段階において細胞に結合

することができたビオチン化抗-Tacの量を減少させ、従って最終段階において結合したフィコエリトリン接合アビジンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(第10A)。当量(20ng)の抗-Tacおよび競合体として使ったヒト化抗-Tacは、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ親和力(3~4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一方がずっと大きな親和力を有するならば、より有効にビオチン化抗-Tacと競争し、従って蛍光をもっと減少させたであろうからである。

ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における最適な使用のため、ヒト化抗体はIL-2レセプターを発現している体内のT細胞を破壊することができるべきである。抗体が標的細胞を破壊し得る1つの機構は、ADCCと略される抗体依存性細胞障害作用(Fundamental Immunology, Paul, W. 編, Raven Press, New York (1984), 681頁)であり、この場合抗体は、標的細胞と標的を溶解することができるマクロファージのようなエフェクター細胞との間に架橋を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac抗体がADCCを媒介することができるかどうかを決定するために、標準法によりクロム放出アッセイを行った。詳しくは、IL-2レセプターを発現するヒト白血病HUT-102細胞を ^{51}Cr と共にインキュベートし、それらにこの放射性核種を吸収させた。次いでHUT-102細胞を過剰量の抗-Tacまたはヒト化抗-Tac抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト組換えIL-2との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血単核細胞である30:1または100:1の比のエフェクター細胞と共に4時間インキュベートした。標的HUT-102細胞の溶解を示す ^{51}Cr の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクター細胞においても、抗-Tacは有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一方ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T細胞白血病または他のT細胞介在性の病気を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1
ADCC後の ^{51}Cr 放出率(%)

抗 体	エフェクター：標的比	
	30:1	100:1
抗-Tac	4%	<1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト免疫グロブリンが他の抗体の多数の利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tacマウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒト組換えIL-2レセプター免疫グロブリンは、より経済的に生産することができ、そして実質的に少ない外来アミノ酸配列を含むことができる。ヒト患者への注入後に抗原性となる可能性の減少は、上記の基準に従って設計された免疫グロブリンにとって有意な療法的改善を意味する。

本発明を明確化および理解のために説明および実施例によ

り幾分詳細に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。

国际调查报告

International Application No. PCT/US89/05857

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF INVENTION (Classification of the International Patent)

IPC (5) : C12P 21/00; C12N 5/10, 7/01, 15/00
U.S. Cl. : 530/387; 435/69.1, 240.1; 536/27

2. FIELD OF SEARCH

Classification Scheme 1 : Classification Scheme 2 :
U.S. : 530/387; 424/85; 435/69.1, 172.3; 536/27; 435/240.1

3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Document	Date of Document	Relevance to Claim
Y, P	US, A 4,816,367 (CARLILLY ET AL.) Issued 28 March 1989, See entire document.	1-22	
X	EP, A 239,400 (WINTER) Issued 30 September 1987 See entire document.	18-22 1-17	
X, P	WO, A 89/01783 (ROCHER ET AL.) Issued 09 March 1989, See entire document.	18-22 1-17	
X	GB, A 2189941 (DIAMANTSTEIN ET AL.) Issued 14 October 1987. See entire document.	1-4, 7-8, 14-15 5-6, 9-13 & 16-22	
Y	Science, Volume 238 Issued 20 November 1987 (WILKIE ET AL.) "Reshaping nature's policies to create anti-cancer reagents", pp 1098-1104. See entire document.	1-22	

(con't)

4. STATEMENT OF THE INVENTION

5. SUMMARY OF THE INVENTION

6. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

7. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

8. CLAIMS

9. ABSTRACT

10. REFERENCES

11. OTHER INFORMATION

12. SIGNATURE OF THE INVENTOR

13. SIGNATURE OF THE ATTORNEY

14. DATE OF FILING OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

15. DATE OF PUBLICATION OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

16. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

17. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

18. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

19. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

20. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

21. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

22. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

23. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

24. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

25. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

26. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

27. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

28. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

29. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

30. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

31. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

32. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

33. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

34. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

35. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

36. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

37. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

38. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

39. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

40. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

41. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

42. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

43. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

44. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

45. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

46. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

47. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

48. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

49. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

50. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

51. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

52. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

53. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

54. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

55. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

56. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

57. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

58. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

59. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

60. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

61. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

62. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

63. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

64. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

65. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

66. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

67. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

68. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

69. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

70. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

71. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

72. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

73. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

74. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

75. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

76. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

77. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

78. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

79. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

80. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

81. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

82. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

83. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

84. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

85. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

86. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

87. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

88. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

89. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

90. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

91. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

92. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

93. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

94. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

95. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

96. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

97. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

98. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

99. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

100. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

Form PCT/ABR/210 (March 1989)

PCT/US89/05857

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

i. Claims 1-10, 14 and 15, drawn to a composition of ~~antibodies~~, ~~antibodies~~ immunoglobulin specific for p23. The and a mixture of reacting T cell disorders using said immunoglobulin, classified in Class 530, subclass 367 and class 424 subclass 85.

ii. Claims 11-13 and 24, drawn to a composition of ~~antibodies~~, ~~antibodies~~ immunoglobulin, classified in Class 435, subclass 87.1, 174.3 and class 344 subclass 387.

iii. Claims 16 and 17, drawn to DNA encoding a human framework region and mixing CDK of an immunoglobulin (chain), classified in Class 530, subclass 27.

The inventions are grouped according to the unity of invention concept recited in Rule 13.2. The inventions are distinct, each from the other because of the following reasons:
Inventions Group III and Group II are related as mutually exclusive species in intermediate-final product relationship.
Inventions Group I and Group II are related as combinative and subcombination. Also, the product of group one can be made by a non-recombinant method, which differs from the product of Group II.

International Application No. PCT/US89/05857

7. FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET

8. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNRESEARCHABLE

9. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

10. STATEMENT OF THE INVENTOR

11. SIGNATURE OF THE INVENTOR

12. SIGNATURE OF THE ATTORNEY

13. DATE OF FILING OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

14. DATE OF PUBLICATION OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

15. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

16. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

17. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

18. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

19. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

20. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

21. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

22. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

23. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

24. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

25. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

26. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

27. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

28. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

29. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

30. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

31. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

32. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

33. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

34. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

35. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

36. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

37. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

38. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

39. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

40. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

41. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

42. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

43. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

44. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

45. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

46. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

47. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

48. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

49. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

50. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

51. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

52. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

53. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

54. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

55. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

56. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

57. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

58. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

59. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

60. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

61. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

62. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

63. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

64. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

65. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

66. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

67. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

68. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

69. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

70. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

71. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

72. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

73. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

74. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

75. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

76. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

77. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

78. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

79. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

80. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

81. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

82. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

83. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

84. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

85. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

86. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

87. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

88. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

89. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

90. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

91. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

92. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

93. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

94. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

95. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

96. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

97. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

98. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

99. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

100. DATE OF RECEIPT OF THE INTERNATIONAL PATENT APPLICATION

Form PCT/ABR/210 (March 1989)

International Application No. PCT/US89/05857

8. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (Continued from the Second Sheet)

Category	Document	Date of Document	Relevance to Claim
Y	Science, Volume 229 Issued 20 September 1985	18-22	
Y	Science, Volume 232 Issued 09 May 1986 WALSHAM "The structure, function and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes," pp. 727-732. See entire document.	1-17	
X	Journal of Immunology, Volume 126(4) Issued 04 April 1981 UCHIDA "A monoclonal antibody (Anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells." See entire document.	1-4, 7-8, 14-15 5-6, 9-13 & 16-22	
X	Science, Volume 239 Issued 25 March 1988 VERHOEVEN ET AL "Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity," pp. 1534-1536. See entire document.	18-22 1-17	
X	Nature, Volume 321 Issued 29 May 1986 JONES ET AL "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse," pp. 522-525. See entire document.	18-22 1-17	
X	Nature, Volume 332 Issued 24 March 1988 RIECHMAN ET AL "Reshaping human antibodies for therapy" pp. 323-326. See entire document.	18-22, 14 1-13 & 15-17	

Form PCT/ABR/210 (March 1989)

第1頁の続き

⑤Int.Cl. *	識別記号	庁内整理番号
A 61 K 39/395	U	8829-4C
C 07 K 15/06		7731-4H
C 12 N 5/10		
		15/13
//(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

優先権主張 ⑤1989年2月13日⑤米国(US)⑤310,252

⑦発明者 セリク, ハロルド エドウィン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニー
スロープ アベニュー 1673

A-11

RECONSTITUTED HUMAN ANTIBODY AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-8

Publication number: JP8217799 (A)

Also published as:

Publication date: 1996-08-27

JP3865418 (B2)

Inventor(s): MATSUSHIMA TSUNAHARU; MATSUMOTO YOSHIHIRO;
YAMADA YOSHIKI; SATO ISAO; TSUCHIYA MASAYUKI;
YAMAZAKI TATSUMI +

Applicant(s): CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD +

Classification:

- International: C12N15/02; A61K39/395; A61P9/00; A61P9/08; A61P9/10;
A61P29/00; C07H21/04; C07K14/52; C07K14/54; C07K16/00;
C07K16/24; C07K16/46; C12N5/00; C12N5/10; C12N5/09;
C12P21/08; C12R1/91; C12N15/02; A61K39/395; A61P9/00;
A61P29/00; C07H21/00; C07K14/435; C07K16/00; C07K16/18;
C07K16/46; C12N5/00; C12N5/10; C12N5/09; C12P21/08;
(IPC1-7): A61K39/395; C07K16/24; C07H21/04; C07K16/46;
C12N5/10; C12N15/02; C12N15/09; C12P21/08; C12N5/10;
C12R1/91; C12P21/08; C12R1/91

- European:

Application number: JP19950177572 19950713

Priority number(s): JP19950177572 19950713; JP19940161481 19940713;
JP19940289951 19941124; JP19940310785 19941214

Abstract of JP 8217799 (A)

PURPOSE: To obtain the subject new antibody comprising light chain and heavy chain variable region of mouse monoclonal antibody against human interleukin-8 (IL-8) and human light chain and heavy chain stationary region and low in antigenicity to human and useful as medical therapy use, etc.
CONSTITUTION: This reconstituted human antibody is obtained by fusing a spleen cell collected by immunizing human IL-8 into a mouse with a mouse myeloma cell, cloning the fused cell to prepare hybridoma, separating mRNA from the resultant hybridoma, using the hybridoma as a template to synthesize cDNA, cloning the cDNA with a primer to afford DNA coding a mouse monoclonal antibody light chain (L chain) variable region (V region) and a heavy chain (H chain) V region, each binding the mouse L chain V region DNA as well as human L chain stationary region (C region) DNA and human L chain V region framework region (FR) DNA, and the mouse H chain V region DNA as well as the human H chain C region DNA and the human H chain V region FR DNA to expression vectors and culturing a host cell transformed with these both expression vectors.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-217799

(43) 公開日 平成8年(1996)8月27日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/24		8517-4H	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 16/46			C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 5/10			C 1 2 P 21/08	
15/02			A 6 1 K 39/395	A B E
審査請求 未請求 請求項の数77 O L (全 45 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-177572	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)7月13日	(72) 発明者	松島 綱治 石川県金沢市つつじが丘210-9
(31) 優先権主張番号	特願平6-161481	(72) 発明者	松本 義弘 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
(32) 優先日	平6(1994)7月13日	(72) 発明者	山田 良樹 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(31) 優先権主張番号	特願平6-289951		
(32) 優先日	平6(1994)11月24日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平6-310785		
(32) 優先日	平6(1994)12月14日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒトインターロイキン-8に対する再構成ヒト抗体

(57) 【要約】

【構成】 (A) (1) ヒトL鎖C領域、及び(2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んでなるL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成るヒトIL-8に対する再構成された抗体。

【効果】 この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは抗原性が低いことから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に医学療法用として期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトインターロイキン-8 (IL-8) に対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域)。

【請求項2】 配列番号: 26に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項1に記載のL鎖V領域。

【請求項3】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) V領域。

【請求項4】 配列番号: 27に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項3に記載のH鎖V領域。

【請求項5】 ヒトL鎖定常領域 (C領域)、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るキメラL鎖。

【請求項6】 前記マウスL鎖V領域が配列番号: 26に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項5に記載のキメラL鎖。

【請求項7】 ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るキメラH鎖。

【請求項8】 前記マウスH鎖V領域が配列番号: 27に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項7に記載のキメラH鎖。

【請求項9】 (1) ヒトL鎖定常領域 (C領域)、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖; 並びに (2) ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖; を含んで成るキメラ抗体。

【請求項10】 前記マウスL鎖V領域が配列番号: 26に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、そして前記マウスH鎖V領域が配列番号: 27に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項9に記載のキメラ抗体。

【請求項11】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域の相補性決定領域 (CDR)。

【請求項12】 下記並びに配列番号: 26に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項11に記載のCDR。

CDR1: Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

CDR2: Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

CDR3: Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg Thr

【請求項13】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR。

【請求項14】 下記並びに配列番号: 27に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項13に記載のCDR。

CDR1: Asp Tyr Tyr Leu Ser

CDR2: Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly

CDR3: Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr

【請求項15】 (1) ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR)、及び (2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR、を含んで成るヒトIL-8に対する抗体の再構成 (reshaped) ヒトL鎖V領域。

【請求項16】 前記CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項15に記載の再構成ヒトL鎖V領域。

【請求項17】 前記FRがヒト抗体REIに由来する、請求項15又は16に記載の再構成ヒトL鎖V領域。

【請求項18】 前記L鎖V領域が、表2においてRVLa又はRVLbとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項15に記載の再構成ヒトL鎖V領域。

【請求項19】 (1) ヒトH鎖V領域のFR、及び (2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項20】 前記CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項19に記載の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項21】 前記FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、およびFR4がヒト抗体4B4に由来する、請求項19又は20に記載の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項22】 前記H鎖V領域が、表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項19に記載の再構成ヒトH鎖V領域。

【請求項23】 (1) ヒトL鎖C領域、並びに (2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体のL鎖。

【請求項24】 前記ヒトL鎖C領域がヒトCκ領域であり、ヒトL鎖FRがREIに由来し、前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項23に記載の再構成ヒト抗体L鎖。

【請求項25】 前記L鎖V領域が表2においてRVLa又はRVLbとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項23に記載の再構成ヒト抗体L鎖。

【請求項26】 (1) ヒトH鎖C領域、並びに (2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体のH

鎖。

【請求項27】 前記ヒトH鎖C領域がヒトC γ 1領域であり、前記ヒトH鎖FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し；FR4がヒト抗体4B4に由来し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項26に記載の再構成ヒト抗体H鎖。

【請求項28】 前記H鎖V領域が表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項26に記載の再構成ヒト抗体H鎖。

【請求項29】 (A) (1) ヒトL鎖C領域、並びに (2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、並びに (2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るH鎖；を含んで成るヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体。

【請求項30】 前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項31】 前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し；前記ヒトL鎖FRがヒト抗体REIに由来し；前記ヒトH鎖FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、FR4がヒト抗体4B4に由来し、前記ヒトL鎖C領域はヒトC κ 領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はヒトC γ 1領域である、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項32】 前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し；前記ヒトL鎖FRがヒト抗体REIに由来し；前記ヒトH鎖FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、FR4がヒト抗体4B4に由来し、前記ヒトL鎖C領域はC κ 領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はC γ 4である、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項33】 前記L鎖V領域が表2においてRVLa又はRVLbとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項34】 前記H鎖V領域が表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項35】 (1) ヒトL鎖C領域；及び(2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体のキメラL鎖をコードするDNA。

【請求項36】 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項35に記載のDNA。

【請求項37】 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項35に記載のDNA。

【請求項38】 (1) ヒトH鎖C領域；及び(2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体のキメラH鎖をコードするDNA。

【請求項39】 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項38に記載のDNA。

【請求項40】 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項38に記載のDNA。

【請求項41】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項42】 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項41に記載のDNA。

【請求項43】 前記L鎖V領域をコードするDNAが配列番号：26に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項41に記載のDNA。

【請求項44】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項45】 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項44に記載のDNA。

【請求項46】 前記H鎖V領域をコードするDNAが配列番号：27に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項44に記載のDNA。

【請求項47】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRをコードするDNA。

【請求項48】 前記CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項47に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項49】 前記CDRが配列番号：26に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項47に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項50】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRをコードするDNA。

【請求項51】 前記CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項50に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項52】 前記CDRが配列番号：27に示され

るヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項 50 に記載の CDR をコードする DNA。

【請求項 53】 (1) ヒト L 鎖 V 領域の FR、及び (2) ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の CDR を含んで成る、ヒト IL-8 に対する抗体の再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 54】 前記 CDR が請求項 12 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 53 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 55】 前記 FR がヒト抗体 REI に由来する、請求項 53 又は 54 に記載の再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 56】 前記 L 鎖 V 領域が表 2 における RVL a 又は RVL b として示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項 53 に記載の DNA。

【請求項 57】 配列番号：62 又は配列番号：65 に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項 53 に記載の DNA。

【請求項 58】 (1) ヒト H 鎖 V 領域の FR、及び (2) ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の CDR、を含んで成る、ヒト IL-8 に対する抗体の再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 59】 前記 CDR が請求項 14 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 58 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 60】 前記 FR 1、2 及び 3 がヒト抗体 VD H 26 に由来し、並びに FR 4 がヒト抗体 4 B 4 に由来する、請求項 58 又は 59 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 61】 H 鎖 V 領域が表 3 および表 4 における RVH a、RVH b、RVH c、RVH d、RVH e、RVH f、RVH g、又は RVH h として示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項 58 に記載の再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA。

【請求項 62】 配列番号：38、41、44、45、48、51、54 又は 55 に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項 58 に記載の DNA。

【請求項 63】 (1) ヒト L 鎖 C 領域；並びに (2) ヒト FR、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の CDR を含んで成る L 鎖 V 領域；を含んで成るヒト IL-8 に対する抗体の再構成ヒト L 鎖をコードする DNA。

【請求項 64】 前記 L 鎖 V 領域が表 2 における RVL a 又は RVL b として示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項 63 に記載の DNA。

【請求項 65】 前記 L 鎖 V 領域が配列番号：62 又は配列番号：65 に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項 63 に記載の DNA。

【請求項 66】 前記ヒト L 鎖 C 領域がヒト L 鎖 C κ 領

域である請求項 63、64 及び 65 のいずれか 1 項に記載の DNA。

【請求項 67】 (1) ヒト H 鎖 C 領域；並びに (2) ヒト FR、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の CDR を含んで成る H 鎖 V 領域；を含んで成るヒト IL-8 に対する抗体の再構成ヒト H 鎖をコードする DNA。

【請求項 68】 H 鎖 V 領域が表 3 および表 4 における RVH a、RVH b、RVH c、RVH d、RVH e、RVH f、RVH g、又は RVH h として示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項 67 に記載の再構成ヒト H 鎖をコードする DNA。

【請求項 69】 前記 H 鎖 V 領域が配列番号：38、41、44、45、48、51、54 又は 55 に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項 67 に記載の DNA。

【請求項 70】 前記ヒト H 鎖 C 領域がヒト H 鎖 Cy 1 領域である請求項 67、68 及び 69 のいずれか 1 項に記載の DNA。

【請求項 71】 前記ヒト H 鎖 C 領域がヒト H 鎖 Cy 4 領域である請求項 67、68 及び 69 のいずれか 1 項に記載の DNA。

【請求項 72】 請求項 35、36、37、38、39、40、63、64、65、66、67、68、69、70 及び 71 のいずれか 1 項に記載の DNA を含んで成るベクター。

【請求項 73】 請求項 72 に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 74】 ヒト IL-8 に対するキメラ抗体の製造方法であって、請求項 35、36 及び 37 のいずれか 1 項に記載の DNA を含んで成る発現ベクター及び請求項 38、39 及び 40 のいずれか 1 項に記載の DNA を含んで成る発現ベクターにより同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項 75】 ヒト IL-8 に対するキメラ抗体の製造方法であって、請求項 35、36 及び 37 のいずれか 1 項に記載の DNA 及び請求項 38、39 及び 40 のいずれか 1 項に記載の DNA を含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項 76】 ヒト IL-8 に対する再構成ヒト抗体の製造方法であって、請求項 63、64、65 及び 66 のいずれか 1 項に記載の DNA を含んで成る発現ベクター及び請求項 67、68、69、70 及び 71 のいずれか 1 項に記載の DNA を含んで成る発現ベクターにより同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項 77】 ヒト IL-8 に対する再構成ヒト抗体の製造方法であって、請求項 63、64、65 及び 66

10

20

30

40

50

のいずれか1項に記載のDNA及び請求項67, 68, 69, 70及び71のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトインターロイキン-8 (IL-8) に対するマウスモノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) 及び可変領域 (V領域)、並びにヒトIL-8に対するヒト/マウスキメラ抗体、ヒト軽鎖 (L鎖) 可変領域及びヒト重鎖 (H鎖) 可変領域の相補性決定領域 (CDR) がヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている再構成 (reshaped) ヒト抗体に関する。本発明はさらに、上記の抗体又はその部分をコードするDNAを提供する。本発明はさらに、前記DNAを含んで成るベクター、特に発現ベクター、並びに該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はさらに、ヒトIL-8に対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン-8 (IL-8) は、リポ多糖 (LPS) で刺激した単球の培養上清より見いだされ、monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) あるいはneutrophil activating protein-1 (NAP-1) 等と称されていた遊走性サイトカイン (chemokine) である。IL-8は様々な細胞により産生され、多形核白血球およびリンパ球に作用して、その濃度勾配に沿って遊走 (chemotaxis) させる活性を有している。また、好中球に対してはその遊走を誘導するばかりでなく、脱顆粒、活性酸素の放出、内皮細胞への接着亢進などの好中球の機能を活性化させる作用を有している。

【0003】炎症性疾患、より詳しくは、嚢胞性肺線維症、特発性肺線維症、成人呼吸促迫症候群、サルコイドーシス、化膿性胸膜炎などの呼吸器疾患、並びに乾癬などの皮膚疾患、並びに慢性リウマチ関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎などの疾患においては、それらの病巣部位に白血球浸潤が病理学的に認められている。また、これら疾患の患者由来の被検物質に、IL-8が検出されており、炎症において中心的役割を果たしていると考えられている。

【0004】(McElvaney, N. G. ら、J. Clin. Invest., 90, 1296-1301, 1992、Lynch III, J. P. ら、Am. Rev. Respir. Dis., 145, 1433-1

439, 1992、Donnelly, S. C. ら、Lancet, 341, 643-647, 1993、Car, B. D. ら、Am. J. Respir. Crit. Care Med., 149, 655-659, 1994、Antony, V. B. ら、J. Immunol., 151, 7216-7223, 1993、Takematsu, H. ら、Arch. Dermatol., 129, 74-80, 1993、Brennan, F. M. ら、Eur. J. Immunol., 20, 2141-2144, 1990、Izzo, R. S. ら、Scand. J. Gastroenterol., 28, 296-300, 1993、Izzo, R. S. ら、Am. J. Gastroenterol., 87, 1447-1452, 1992)。

【0005】Ko, Y-C. らは、ヒトIL-8を抗原としてマウスに免疫することにより、ヒトIL-8に結合し、かつ、その結合によってヒトIL-8が好中球に結合することを阻害する、すなわちヒトIL-8が有する生物学的活性を中和するマウスモノクローナル抗体WS-4を調製した。マウスモノクローナル抗体WS-4のアイソタイプは、κ型L鎖及びCγ1型H鎖であることが明らかになっている (J. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992)。

【0006】WS-4以外の抗ヒトIL-8抗体としては、A. 5. 12. 14 (Boylan, A. M. ら、J. Clin. Invest., 89, 1257-1267, 1992)、国際特許出願WO92-04372に開示されている抗Pep-1抗体または抗Pep-3抗体あるいはDM/C7 (Mulligan, M. S. ら、J. Immunol., 150, 5585-5595, 1993) 等が知られている。

【0007】家兎を用いた実験系に於て、マウスモノクローナル抗体WS-4を投与することによって、肺虚血・再灌流障害 (Sekido, N. ら、Nature, 365, 654-657, 1993)、LPS誘導の皮膚炎 (Harada, A. ら、Internat. Immunol., 5, 681-690, 1993)、LPSあるいはインターロイキン-1 (IL-1) 誘導の関節炎 (Akahoshi, T. ら、Lymphokine and Cytokine Res., 13, 113-116, 1994) における好中球浸潤が抑制されたことが見いだされた。

【0008】家兎にもヒトIL-8の相同体 (homologue) が存在し、ウサギIL-8と称されている。マウスモノクローナル抗体WS-4はウサギIL-8に対して交差反応し、ウサギIL-8がウサギ好中球に結合するのを阻害することが明らかになっている (Harada, A. ら、Internat. Immunol., 5, 681-690, 1993) ので、これらのことは、ヒトにおける炎症性疾患の治療のための療法

剤として抗ヒトIL-8抗体が有用であることを示唆している。

【0009】ヒト以外の哺乳類由来のモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性（「抗原性」という場合もある）があり、そしてこの理由のため、ヒトにおけるそれらの医学療法的価値は制限される。例えば、マウス抗体をヒトに投与しても異物として代謝されるので、ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を十分に発揮できない。さらに、投与したマウス抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体は、血清病あるいは他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応答を惹起する。そしてこの理由のため、ヒトにマウス抗体を頻回投与することはできない。

【0010】これらの問題を解決するため、ヒト型化（humanized）抗体の製造方法が開発された。マウス抗体は2つの方法でヒト型化することができる。より簡単な方法としては、可変領域（V領域）はもとのマウスモノクローナル抗体に由来し、定常領域（C領域）は適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法がある。得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の可変領域を完全なかたちで含有するので、もとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することが期待できる。

【0011】さらに、キメラ抗体ではもとのマウス抗体に比べヒト以外の動物に由来する蛋白質配列の比率が実質的に減少しているためもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体は抗原によく結合しそして免疫原性が低いが、それでもなおマウス可変領域に対する免疫応答が生ずる可能性がある（LoBuglio, A. F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989）。

【0012】マウス抗体をヒト型化するための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体が有する潜在的な免疫原性を大幅に低下させるものである。この方法においては、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）のみをヒト可変領域に移植して「再構成」（reshaped）ヒト可変領域を作製する。ただし必要によっては、再構成ヒト可変領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているフレームワーク領域（FR）の一部の蛋白質配列をマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植する場合がある。

【0013】次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト抗体のヒト以外の蛋白質配列に由来する部分はCDR、および、極く一部のFRのみである。CDRは超可変蛋白質配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さない。この理由のため、マウスCDRを担持する再構

成ヒト抗体はもはやヒトCDRを含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

【0014】再構成ヒト抗体についてはさらに、Riechmann, L. ら、Nature, 332, 323-327, 1988; Verhoeyen, M. ら、Science, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. ら、Protein Eng., 4, 773-783, 1991; Maeda, H. ら、Hum. Antibodies Hybridomas, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P. R. ら、Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Carter, P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. ら、J. Immunol., 148, 1149-1154, 1992; および Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】前記のごとく、再構成ヒト抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体は知られていない。さらに、再構成ヒト抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在しない。従って、特定の抗原に対して十分な結合活性あるいは／ならびに中和活性を示す再構成ヒト抗体を作製するためには種々の工夫が必要である（例えば、Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 851-856, 1993）。従って、本発明はヒトIL-8に対する、免疫原性の低い抗体を提供するものである。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明はヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供する。本発明はまた、該再構成ヒト抗体の作製の過程で有用であるヒト／マウスキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、再構成ヒト抗体の断片を提供する。並びに本発明はキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそれらの断片の製造のための発現系を提供する。本発明はさらにまた、ヒトIL-8に対するキメラ抗体およびそれらの断片の製造方法、及びヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体およびそれらの断片の製造方法を提供する。

【0017】さらに具体的には、本発明は、（1）ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；並びに（2）ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域；を提供する。本発明はさらに、（1）ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対する

マウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を提供する。

【0018】本発明はさらにまた、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対するキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、(1)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域；を提供する。

【0019】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を提供する。本発明はさらにまた、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対するキメラ抗体を提供する。

【0020】本発明はさらに、(1)ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；並びに(2)ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR；を提供する。本発明はさらに、(1)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR；を提供する。

【0021】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域；並びに(1)ヒトH鎖V領域のFR；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域を提供する。

【0022】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域；並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖；並びに(1)ヒトH鎖C領域；並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領

域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖を提供する。

【0023】本発明はさらにまた、

(A) (1)ヒトL鎖C領域、並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖；並びに

(B) (1)ヒトH鎖C領域、並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供する。

【0024】本発明はさらに詳しくは(1)以下のアミノ酸配列に示す又はその一部を有する、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域のCDR、

CDR1；Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

CDR2；Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

CDR3；Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg Thr

並びに(2)以下のアミノ酸配列に示す又はその一部を有する、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域のCDR、

CDR1；Asp Tyr Tyr Leu Ser

CDR2；Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr

Arg Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly

CDR3；Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr

を提供する。

【0025】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域；並びに(1)ヒトH鎖V領域のFR；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域を提供する。

【0026】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域；並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖；並びに(1)ヒトH鎖C領域；並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖を提供する。

【0027】本発明はさらにまた、

(A) (1)ヒトL鎖C領域、並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖CDRを含んで成るL鎖；並びに

(B) (1)ヒトH鎖C領域、並びに(2)ヒトH鎖FR

R、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖CDRを含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供する。*

*【0028】前記ヒトL鎖FRは以下のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

FR 1 : Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
FR 2 : Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr
FR 3 : Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
Thr Tyr Tyr Cys
FR 4 : Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【0029】または、

FR 1 : Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
FR 2 : Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr
FR 3 : Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
Thr Tyr Tyr Cys
FR 4 : Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【0030】前記ヒトH鎖FRは以下のアミノ酸配列を※ ※有するものが挙げられる。

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Ser
FR 2 : Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val Gly
FR 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr
Tyr Cys Ala Arg
FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0031】

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Ser
FR 2 : Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
FR 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr
Tyr Cys Ala Arg
FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0032】

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
Phe Ser
FR 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val Gly
FR 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr
Tyr Cys Ala Arg
FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0033】

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

15

16

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0034】

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0035】

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0036】

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【0037】または、

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【0038】本発明はまた、前記種々の抗体を構成するポリペプチド、又はその断片をコードするDNAに関する。本発明はまた、上記DNAを含んで成るベクター、例えば発現ベクターに関する。本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。本発明はさらにまた、ヒトIL-8に対するキメラ抗体およびその断片の製造方法、及びヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体およびその断片の製造方法を提供する。

【0039】

【具体的な説明】

マウスV領域をコードするDNAのクローニング

ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードする遺伝子をクローニングするためには、該遺伝子の取得源として、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することが必要である。ハイブリドーマからmRNAを抽出

した後、既知の方法により一本鎖cDNAに変換し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて目的とするDNAを増幅することで得られる。この遺伝子の取得源として、Ko, Y-C. らが作製した、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマWS-4があげられる。このハイブリドーマの作製方法はJ. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992に記載されており、これを参考例1に後記する。

【0040】(1) 全RNAの採取

マウスモノクローナル抗体のV領域をコードする目的のDNAをクローン化するため、グアニジンチオシアネート処理によりハイブリドーマ細胞を破壊し、塩化セシウム密度勾配遠心(Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979)をおこなって全RNAを得ることができる。なお、他の蛋白質の遺伝子をクローニングする際に用いられたすでに報告されている方法、例えばバナジウム複合体などのリボヌクレアーゼ(RNase)インヒビター存在下で、界面活性剤処理、フェノール処理をおこなう方法(Berger, S. L. ら、Biochemistry, 18, 5143-5149, 1979)を用いることもできる。

【0041】(2) cDNAの合成

次に、mRNAの3'末端に局在するpolyA鎖に相補的なオリゴヌクレオチドであるオリゴ(dT)をプライマーとして、上記のごとくして得た全RNAに含まれているmRNAを鋳型に、逆転写酵素で処理してmRNAに相補的な一本鎖cDNAを合成することができる(Larrick, J. W. ら、Bio/Technology, 7, 934-938, 1989)。また、その時にランダムプライマーを用いても良い。なお、mRNAだけを取得する場合は、全RNAをオリゴdTセルロースカラムにかけpolyA鎖を有するmRNAだけを分離することができる。

【0042】(3) ポリメラーゼ連鎖反応によるV領域をコードするDNAの増幅

次に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて前記V領域をコードするcDNAを特異的に増幅する。マウスモノクローナル抗体のカッパ(κ)型L鎖V領域の増幅のため、配列番号: 1~11に示す11種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Variable; MKV)及び配列番号: 12に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Constant; MKC)をそれぞれ5'末端プライマー及び3'末端プライマーとして使用する。前記MKVプライマーはマウスカッパ型L鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MKCプライマーはマウスカッパ型L鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。

【0043】マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の増幅のため、配列番号: 13~24に示す12種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Variable; MHV)及び配列番号: 25に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Constant; MHC)をそれぞれ5'末端プライマー及び3'末端プライマーとして使用する。前記MHVプライマーはマウスH鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MHCプライマーはマウスH鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。

【0044】なお、全ての5'末端プライマー(MKV及びMHV)はその5'末端近傍に制限酵素SalI切断部位を提供する配列GTCGACを含有し、そして、全ての3'末端プライマー(MKC及びMHC)はその5'末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有する。これらの制限酵素切断部位は両V領域をコードする目的のDNA断片をそれぞれのクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる。これらの制限酵素切断部位が、両V領域をコードする目的のDNA配列中にも存在する場合、それぞれのクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でも良い。

【0045】(4) V領域をコードするDNAの単離
次に、目的とするマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNA断片を得るために、PCR増幅生成物を低融点アガロースゲルあるいはカラム[PCR産物精製用キット(QIAGEN PCR Purification Spin Kit: QIAGEN社製)、DNA精製用キット(GENECLEANII: BIO101社製)]等により、分離、精製をおこなう。その精製物を制限酵素SalI及びXmaIで酵素処理して、マウスモノクローナル抗体の目的とするV領域をコードするDNA断片を得る。

【0046】他方、プラスミドpUC19のごとき適当なクローニングベクターを同じ制限酵素SalI及びXmaIにより切断させ、このpUC19に前記DNA断片を酵素的に連結することにより、マウスモノクローナル抗体の目的とするV領域をコードするDNA断片を含むプラスミドを得る。クローニングされたDNAの配列決定は任意の常法に従って行うことができ、例えば、自動DNAシーケンサー(Applied Biosystems Inc. 製)が挙げられる。目的とするDNAのクローニング及びその配列決定を実施例1及び実施例2に具体的に記載する。

【0047】相補性決定領域(CDR)

本発明はさらに、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のV領域の超V領域又は相補性決定領域(CDR)を提供する。抗体のL鎖及びH鎖の両V領域は抗

原結合部位を形成する。L鎖及びH鎖上のこの領域は類似する基本的構造を有する。両鎖のV領域は配列が比較的保存された4個のフレームワーク領域を含み、それらは3個の超V領域又はCDRにより連結されている(Kabat, E. A. ら, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1991)。

【0048】前記4個のフレームワーク領域(FR)の多くの部分はβシート構造をとり、3個のCDRはループを形成する。CDRはある場合にはβシート構造の一部分を形成することもある。FRによって3個のCDRは相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして、対をなす3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。本発明は、ヒト型化抗体の素材として有用なこれらのCDR、及びそれをコードするDNAをも提供する。これらのCDR領域は、V領域の既知アミノ酸配列と照合することによって、Kabat, E. A. ら, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から決定することができ、実施例3において具体的に説明する。

【0049】キメラ抗体の作製

ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトV領域を設計するに先立って、使用するCDRが実際に抗原結合領域を形成することを確かめる必要がある。この目的のため、キメラ抗体を作製した。キメラ抗体を作製するためにキメラ抗体のL鎖並びにH鎖をコードするDNAを構築する必要がある。両DNAを構築する基本的な方法は、PCRクローン化cDNAに見られるマウスリーダー配列及びマウスV領域配列のそれぞれのDNA配列を、哺乳類細胞発現ベクター中にすでに存在するヒトC領域をコードするDNA配列に連結することである。

【0050】前記ヒト抗体C領域は、任意のヒトL鎖C領域および任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えば、L鎖についてはヒトL鎖CκあるいはCλ、H鎖についてはIgGであればCy1, Cy2, Cy3あるいはCy4(Elison, J. ら, DNA, 1, 11-18(1981), Takahashi, N. ら, Cell, 29, 671-679(1982), Krauswinkel, U. ら, EMBO J. 1, 403-407(1982))あるいは他のアイソタイプをそれぞれ挙げることができる。

【0051】キメラ抗体の製造のためには2種類の発現ベクターを作製する。即ち、エンハンサー/プロモーター系のような発現制御領域による制御のもとで、マウスL鎖V領域ならびにヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んでなる発現ベクター、およびエンハンサー/プロモーター系のような発現制御領域による制御のもとで、マウスH鎖V領域ならびにヒトH鎖C領域をコードする

DNAを含んでなる発現ベクターを作製する。次に、これらの両発現ベクターにより哺乳類細胞などの宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインビトロまたはインビボで培養してキメラ抗体を製造する(例えば、WO91-16928)。

【0052】あるいは、マウスL鎖V領域ならびにヒトL鎖C領域をコードするDNAおよびマウスH鎖V領域ならびにヒトH鎖C領域をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そして、該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、そして形質転換された細胞をインビトロまたはインビボで培養してキメラ抗体を製造することもできる。

【0053】モノクローナル抗体WS-4からのキメラ抗体の作製を実施例4に記載する。マウスWS-4κ型L鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAをPCR法を用いてクローニングし、ヒトL鎖Cκ領域をコードするヒトゲノムDNAを含有する発現ベクターに連結する。同様にマウスWS-4抗体のH鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAをPCR法を用いてクローニングし、ヒトCy1領域をコードするゲノムDNAを含有する発現ベクターに連結する。

【0054】より詳しくは、特に設計されたPCRプライマーを用いて、マウスWS-4抗体のV領域をコードするcDNAをそれらの5'及び3'末端において適当な塩基配列を導入して(1)それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つ(2)それらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした(例えば、本発明ではKozak配列を導入することにより転写効率を上げるよう工夫してある)。

【0055】次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たマウスWS-4抗体のV領域をコードするDNAを、所望のヒトC領域をすでに含有するHEF発現ベクター(図1参照)に挿入した。これらのベクターは、種々の哺乳類細胞系における遺伝子操作された抗体の一過性(transient)発現又は安定な発現のために適当である。このように作製したキメラWS-4抗体の結合活性を試験したところ、キメラWS-4抗体はヒトIL-8に結合する活性を示した(図2参照)。従って、正しいマウスV領域がクローニングされ、そして正しく配列が決定されていたことが示された。

【0056】再構成ヒトWS-4抗体の設計

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、移植するCDRを有するマウスモノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列と、CDRが移植されるヒトモノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列との間に高い同一性が存在することが望ましい。

【0057】この目的のためには、マウスモノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列とヒトモノクローナル抗体

のFRのアミノ酸配列とを比較することにより、再構成ヒトWS-4抗体のV領域の設計の基礎となるヒトV領域を選択することが可能になる。具体的には遺伝子解析ソフトGENETX (Software Development Co., Ltd.) を用いてマウスWS-4抗体のL鎖及びH鎖のV領域を、National Biomedical Research Foundation (NBRF) のデータベースに見出されるすべての既知のヒトのV領域と比較した。

【0058】マウスWS-4抗体のL鎖V領域は、既知のヒト抗体L鎖V領域との比較においてヒト抗体HAU (Watanabe, S. ら、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1291-1295, 1970) のL鎖V領域に最も類似しており、69.2%の同一性が存在する。一方、WS-4抗体のH鎖V領域は、既知のヒト抗体H鎖V領域との比較においてヒト抗体VDH26 (Buluwel a., L. ら、EMBO J., 7, 2003-2010, 1988) に最も類似しており、71.4%の同一性が存在する。

*20

*【0059】一般的に、マウスV領域のアミノ酸配列のヒトV領域のアミノ酸配列に対する同一性は、マウスV領域のアミノ酸配列に対する同一性よりも低い。これはマウスWS-4抗体のV領域がヒトV領域に完全には類似していないこと示し、そして同時に、ヒト患者における免疫原性の問題を解決するためにマウスWS-4のV領域をヒト型化する (humanize) ことが最善であることを示している。

【0060】マウスWS-4抗体のV領域をさらに、Kabat, E. A. ら、(1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Officeにより定義されるヒトV領域サブグループのコンセンサス配列と比較し、V領域のFR間で対比された。その結果を表1に示す。

【0061】

【表1】

表1 マウスWS-4のV領域のFRと、種々のサブグループのヒトV

領域のコンセンサス配列のFRとの間の同一性 (%)

A. L鎖V領域におけるFR

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
64.4	51.3	57.3	57.5

B. H鎖V領域におけるFR

HSG I	HSG II	HSG III
46.9	40.9	62.3

【0062】マウスWS-4抗体のL鎖V領域のFRはヒトL鎖V領域のサブグループ I (HSG I) のFRのコンセンサス配列に最も類似しており、64.4%の同一性が存在する。一方、マウスWS-4のH鎖V領域のFRはヒトH鎖V領域のサブグループ III (HSG III) のFRのコンセンサス配列に最も類似しており、62.3%の同一性が存在する。

【0063】これらの結果は、既知のヒト抗体との比較から得られた結果を支持しており、ヒト抗体HAU中のL鎖V領域はヒトL鎖V領域のサブグループ I に属し、そしてヒト抗体VDH26中のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のサブグループ III に属する。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の設計のためにはサブグループ I (HSG I) に属するヒトL鎖V領域を使用し、そして再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の設計のためにはサブグループ III (HSG III) に属するヒト抗体H鎖V領域を用いるのが最善であろう。

【0064】既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、マウスWS-4抗体のL鎖V領域はヒトL鎖V領域

のサブグループ I の1構成員であるヒト抗体REIのL鎖V領域にも類似していた。従って、再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の設計においてREIのFRを使用した。REIに基づくこれらのヒトFR中には、原著のヒトREI (Palm, Wら、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 167-191, 1975; Epp, O. ら、Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975) に比較して5個のアミノ酸 (位置39, 71, 104, 105及び107; 表2を参照) の相違が存在する。

【0065】なお、表におけるアミノ酸番号はKabat, E. A. ら (1991) の経験に基づいている。位置39及び71における2個のアミノ酸の変化はラットCAMPATH-1H抗体のL鎖V領域のFR中に存在するアミノ酸にもどる変化であった (Riechmanら、1988)。Kabatら、(1991) によれば、FR4中の3個のアミノ酸の変化 (位置104, 105及び107) は他のヒトκL鎖からのJ領域に基づいており、ヒトから逸脱するものではない。

23

【0066】再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の2つのバージョンを設計した。第一のバージョンRVLaにおいては、FRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に存在するREIに基くFR (Riechmannら、1988)と同一であり、そしてCDRはマウスWS-4抗体のL鎖V領域中のCDRと同一にした。第二のバージョンRVLbはRVLaに基き、ヒトFR3中の位置71におけるアミノ酸1個のみを異にする。Chothia, C. ら、J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987により定義されるごとく、残基71はL鎖V領域のCDR1の標準的 (canonical) 構造の部分である。

表2 再構成ヒトWS-4 L鎖V領域の設計

	1	2	3	4
	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	
WS-4L	DIQMTQSPASLSASVGTITC	RASEIIVSYLA	WYQKQKSPQLLVY	
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC		WYQKPGKAPKLLIY	
RVLa	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASEIIVSYLA	WYQKPGKAPKLLIY	
RVLb	-----	-----	-----	
	FR1	CDR1	FR2	
	5	6	7	8
	0123456	7890123456789012345678	901234567	
WS-4L	NAKTLAD	GVSSRPSGSGSGTQFSLRISLQPEDFGSYTC	QHHFGFPRT	
REI		GVPSRPSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYC		
RVLa	NAKTLAD	GVPSRPSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYC	QHHFGFPRT	
RVLb	-----	-----Y-----	-----	
	CDR2	FR3	CDR3	
	10			
	8901234567			
WS-4L	FGGCTKLBK			
REI	FGQGTKVBIK			
RVLa	FGQGTKVBIK			
RVLb	-----			
	FR4			

【0069】注：REIのFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に見出されるものである (Riechmannら、1988)。REIのFR中の5個の下線を付したアミノ酸はヒトREIのアミノ酸配列と異なるアミノ酸である。なお、アミノ酸は一文字表記による。アミノ酸番号はKabataらの定義によるものである。マウスWS-4抗体のH鎖V領域中のFRはサブグループIIIに属するヒトH鎖V領域に最も類似している (表1)。

【0070】マウスWS-4抗体のH鎖V領域は、既知のヒトH鎖V領域との比較において、FR1からFR3までは、ヒトH鎖V領域のサブグループIIIの1構成員

24

*【0067】この位置のアミノ酸はL鎖V領域のCDR1ループの構造に直接影響すると予想され、それ故に抗体結合に大きく影響すると考えられている。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域のRVLbにおいては、位置71のフェニルアラニンがチロシンに変えられている。表2は、マウスWS-4抗体のL鎖V領域、再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中での使用のために修飾されたREIのFR (Riechmannら、1988)及び再構成ヒトWS-4抗体のL鎖V領域の2種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を示す。

【0068】

【表2】

であるヒト抗体VDH26のH鎖V領域 (Bulwella, L. ら、EMBO J., 7, 2003-2010, 1988)に最も類似していた。FR4については、VDH26のFR4の配列が明らかになっていなかったため、サブグループIIIに属するヒト抗体4B4 (Sanz, I. ら、J. Immunol., 142, 883-887, 1989)のFR4のアミノ酸配列を用いることとした。これらのヒトH鎖V領域を、再構成ヒトWS-4抗体のH鎖V領域の設計のための基礎として用いた。

【0071】再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の8種類のバージョンを設計した。8種類のバージョンのすべ

25

てにおいて、ヒトFR1、2及び3はヒト抗体VDH26のFR1、2及び3に、FR4はヒト抗体4B4のFR4に基いており、そして、マウスCDRはマウスWS-4抗体H鎖V領域のCDRと同一である。表3および4に、マウスWS-4抗体のH鎖V領域、鋳型のヒト抗*

26

*体VDH26のFR1～3、ヒト抗体4B4のFR4および再構成ヒトWS-4抗体のH鎖V領域の8種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を示す。

【0072】

【表3】

再構成ヒトWS-4 H鎖V領域の設計（表4につづく）

	1	2	3
	123456789012345678901234567890	12345	
WS-4H	EVKLVEGGGLIQPGDSLRLSCVTSGPTFS	DYYLS	
VDH26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFS		
RVHa～h	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFS	DYYLS	
	FR1	CDR1	
	4	5	6
	67890123456789	012ABC3456789012345	
WS-4H	WVRQPPGKALEWVG	LIRNKANGYTREYSASVKG	
VDH26	WVRQAQKGLELVG		
RVHa	WVRQAQKGLELVG	LIRNKANGYTREYSASVKG	
RVHb	-----W--	-----	
RVHc	----P-----	-----	
RVHd	----P----W--	-----	
RVHe	---PP----W--	-----	
RVHf	----P--A--W--	-----	
RVHg	----P----W--	-----	
RVHh	-----W--	-----	
	FR2	CDR2	

【0073】

30 【表4】

	7	8	9	100
	67890123456789012ABC345678901234			567890ABC12
WS-4H	RPTISRDDSQSILYLQMNTLRGSDSATYYCAR			BNRYDVBLAY
VDH26	RLTISRSDSKNTLYLQMSSSLKTEDLAVYYCAR			
RVHa	RLTISRSDSKNTLYLQMSSSLKTEDLAVYYCAR			BNRYDVBLAY
RVHb	-----			-----
RVHc	-----			-----
RVHd	-----			-----
RVHe	-----			-----
RVHf	-----			-----
RVHg	-F-----			-----
RVHh	-F-----			-----
	FR3			CDR3

110

	34567890123	注: RVHa~h はRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg及びRVHhを示す。
WS-4H	WGQGLVTVSA	
4B4	WGQGLVTVSS	なお、アミノ酸は一文字表記による。
RVHa~h	WGQGLVTVSS	アミノ酸番号は Kabatらの定義によるものである。
	FR4	

【0074】再構成ヒトWS-4抗体V領域をコードするDNAの作製

再構成ヒトWS-4抗体V領域の作製を実施例5に具体的に記載する。再構成ヒトWS-4抗体L鎖及びH鎖V領域のそれぞれの第一バージョンをコードするDNAを合成した。そして配列決定して、再構成ヒトWS-4抗体L鎖及びH鎖V領域のバージョン「a」の全体DNA配列が正しいアミノ酸配列をコードしていることを確認した。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号: 62に、再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号: 38に示す。

【0075】再構成ヒトWS-4抗体V領域の他のバージョンをコードするDNAは、第一バージョン「a」を鋳型に、公表されているPCR-変異誘発法(Kammann, Mら、Nucleic Acids Res., 17, 5404, 1989)にわずかな変更を加えた方法を用いて作製した。再構成ヒトWS-4抗体V領域の設計に関して記載したように、再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の1つの追加のバージョン(バージョン「b」)をコードするDNAを作製し、そして再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の7種類の追加のバージョン(バージョン「b」, 「c」, 「d」, 「e」, 「f」, 「g」及び「h」)をコードするDNAを作製した。

【0076】これらの追加のバージョンは、第一バージョンからのアミノ酸配列の一連の微細な変化を含み、アミノ酸配列のこれらの微細な変化はPCR変異誘発を用いてDNA配列の微細な変更を行うことにより達成された。DNA配列に必要な変化を導入するPCRプライマーが設計された。一連のPCR反応に続き、PCR生成物をクローン化し、そして配列決定してDNA配列中の変化が計画通りに起っていることを確認した。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域バージョン「b」の配列を配列番号: 65に、再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域バージョン「b」, 「c」, 「d」, 「e」, 「f」, 「g」, 「h」のそれぞれの配列を配列番号41, 44, 45, 48, 51, 54, 55に示す。

【0077】再構成ヒトWS-4抗体V領域の種々のバージョンのDNA配列を配列決定により確認した後、再構成ヒトWS-4抗体V領域をコードするDNAを、ヒトC領域をコードするDNAをすでに含有する哺乳類細胞発現ベクターにサブクローニングした。即ち、再構成ヒトWS-4抗体V鎖L領域をコードするDNAをヒトL鎖C領域をコードするDNA配列に、再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域をコードするDNAをヒトCy1領域をコードするDNA配列にそれぞれ連結した。

【0078】次に再構成ヒトL鎖V領域バージョン「a」あるいは「b」と、H鎖V領域バージョン「a」~「h」のすべての組合せをヒトIL-8への結合につ

いて試験し、そしてその結果、図7に記載するように、L鎖バージョン「a」または「b」とH鎖バージョン「g」とを含んで成る両再構成ヒト抗体（RVL a/RVHg及びRVL b/RVHg）がキメラWS-4抗体と同じレベルでIL-8に結合する能力を示した。

【0079】ヒトIL-8に対する本発明のキメラ抗体又は再構成ヒト抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができ、好ましくは、本発明のキメラ抗体又は再構成抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

【0080】これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス前期（human cytomegalovirus immediate early；HCMV）プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HCγ1、HCMV-VL-HCκ等があり、pSV2neoに由来するもの（国際公開出願WO92-19759を参照）が含まれる。

【0081】また、その他に本発明に用いることのできる哺乳動物細胞に於ける遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）等のウィルスプロモーター、あるいは、ヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター-1α（HEF-1α）等の哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えば、SV40のプロモーターを使用する場合は、Mulligan, R. C. らの方法（Nature, 277, 108-114, 1979）、また、HEF-1αプロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法（Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990）に従えば実施することができる。

【0082】本発明のために有用なプロモーターの他の具体例はHEF-1αプロモーターである。このプロモーターを含有する発現ベクターにはHEF-VH-γ1及びHEF-VL-γκ（図1）が含まれる。複製起点としては、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40、牛パピローマウイルス（BPV）等の由来のDNA配列を用いることができ、さらに、宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、選択マーカーとして、アミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼあるいはneo耐性遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPR T）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子を用いることができる。

【0083】要約すれば、本発明はまず、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及びH鎖V領域、並びに該L鎖V領域をコードするDNA及び該H鎖V領域をコードするDNAを提供する。これらは、ヒトIL-8に対するヒト/マウスキメラ抗体及び再構成ヒト抗体の作製のために有用である。モノクローナル抗体としては、例えばWS-4があげられる。L鎖V領域は例えば配列番号：26に示すアミノ酸配列を有し、そしてH鎖V領域は例えば配列番号：27に示すアミノ酸配列を有する。これらのアミノ酸配列は例えばそれぞれ配列番号：26、27に示すヌクレオチド配列によりコードされている。

【0084】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体は、（1）ヒトL鎖C領域及びマウスL鎖V領域；並びに（2）ヒトH鎖C領域及びマウスH鎖V領域；から構成される。マウスL鎖V領域及びマウスH鎖V領域並びにこれらをコードするDNAは前記の通りである。前記ヒトL鎖C領域は任意のヒトL鎖C領域であることができ、そして例えばヒトCκあるいはCλ領域である。前記ヒトH鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、そして例えばヒトCγ1、Cγ2、Cγ3あるいはCγ4領域（Ellison, J. ら、DNA, 1, 11-18（1981）、Takahashi, N. ら、Cell, 29, 671-679（1982）、Krawinkel, U. ら、EMBO J., 1, 403-407（1982））である。

【0085】キメラ抗体の製造のためには2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、並びにエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する。

【0086】あるいは、マウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNA並びにマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

【0087】本発明の再構成ヒトWS-4抗体は、（A）（1）ヒトL鎖C領域、及び（2）ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

（B）（1）ヒトH鎖C領域、及び（2）ヒトH鎖FR

R、及びヒト I L-8 に対するマウスモノクローナル抗体 WS-4 の H 鎖 CDR を含んで成る H 鎖 V 領域、を含んで成る H 鎖；から構成される。

【0088】好ましい態様においては、前記 L 鎖 CDR は配列番号：26 に示されるアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列の範囲が表 5 において定義されるアミノ酸配列を有し、前記 H 鎖 CDR は配列番号：27 に示されるアミノ酸配列であって該アミノ酸配列の範囲が表 5 において定義されるアミノ酸配列を有し；前記ヒト L 鎖 FR が R E I に由来するものであり；前記ヒト H 鎖 FR 1、2 および 3 は V D H 26 に、FR 4 は 4 B 4 に由来するものであり；前記ヒト L 鎖 C 領域はヒト C κ 領域であり；そして前記ヒト H 鎖 C 領域はヒト C γ 1 領域である。また、前記ヒト H 鎖 C 領域はヒト C γ 4 領域であってもよく、あるいは前記ヒト L 鎖 C 領域および／またはヒト H 鎖 C 領域のかわりにラジオアイソトープを結合させてもよい。特定の抗原に対して十分に活性がある再構成ヒト抗体を作製するために、前記ヒト FR のアミノ酸配列の一部を置換することが望ましい。

【0089】好ましい態様においては、L 鎖 V 領域は表 2 において R V L a あるいは R V L b として示されるアミノ酸配列を有し、H 鎖 V 領域は表 3 および表 4 に R V H a、R V H b、R V H c、R V H d、R V H e、R V H f、R V H g 又は R V H h として示されるアミノ酸配列を有する。さらに、H 鎖 V 領域 FR 2 中の 41 位のアミノ酸がプロリンであること、同 47 位のアミノ酸がトリプトファンであること、および／または同 FR 3 中の 67 位のアミノ酸がフェニルアラニンであることがよく、R V H b、R V H d、R V H e、R V H f、R V H g 又は R V H h として示されるアミノ酸配列を有するものがより好ましい。このうち、R V H g が H 鎖 V 領域として最も好ましい。

【0090】再構成抗体の製造のためには、2 種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとに前に定義した再構成ヒト L 鎖をコードする DNA を含んで成る発現ベクター、及びエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとに前に定義した再構成ヒト H 鎖をコードする DNA を含んで成るもう一つの発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターを用いて哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そしてこの形質転換された細胞をインービボ又はインービトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる。

【0091】あるいは、再構成ヒト L 鎖をコードする DNA 及び再構成ヒト H 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに導入し、そしてこのベクターを用いて宿主を形質転換し、次にこの形質転換された宿主細胞をインービボ又はインービトロで培養して目的とする再構成ヒト抗体を生産せしめる。こうして生産されたキメラ抗体又は再構成ヒト抗体は、常法に従って、例えばプロテ

ン A アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等により単離、精製することができる。

【0092】本発明のキメラ L 鎖又は再構成ヒト L 鎖は H 鎖と組合わせることにより完全な抗体を作製するために使用することができる。同様に本発明のキメラ H 鎖又は再構成ヒト H 鎖は L 鎖と組合わせることにより完全な抗体を作製するために用いることができる。本発明のマウス L 鎖 V 領域、再構成ヒト L 鎖 V 領域、マウス H 鎖 V 領域、及び再構成ヒト H 鎖 V 領域は、本来、抗原であるヒト I L-8 と結合する領域であり、それ自体として、又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。また、本発明の L 鎖 V 領域 CDR 及び H 鎖 V 領域 CDR も、本来、抗原であるヒト I L-8 と結合する部分であり、それ自体として又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。

【0093】本発明のマウス L 鎖 V 領域をコードする DNA はキメラ L 鎖をコードする DNA 又は再構成ヒト L 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。同様にマウス H 鎖 V 領域をコードする DNA はキメラ H 鎖をコードする DNA 又は再構成ヒト H 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。また、本発明の L 鎖 V 領域 CDR をコードする DNA は再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする DNA 及び再構成ヒト L 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。

【0094】同様に本発明の H 鎖 V 領域 CDR をコードする DNA は再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA 及び再構成ヒト H 鎖をコードする DNA 作製のために有用である。さらには、再構成ヒト抗体の F (a b')₂、F a b あるいは F v を、又は、H 鎖及び L 鎖の両 F v を連結させたシングルチェーン F v を適当な宿主で産生させ、前述の目的に使用することができる（例えば、Bird, R. E. ら、T I B T E C H, 9, 132-137, 1991 を参照）。

【0095】シングルチェーン F v は、ヒト I L-8 に対する再構成ヒト抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域を連結してなる。このシングルチェーン F v において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリンカーを介して連結されている（H u s t o n, J. S. ら、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A., 85, 5879-5883, 1988）。

【0096】シングルチェーン F v における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、再構成ヒト抗体の H 鎖および L 鎖 V 領域として前記記載されたもののいずれであってもよい。具体例として、配列番号 38, 41, 44, 45, 48, 51, 54, 55 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域と、配列番号 62, 65 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域を含んでなるシングルチェーン F v が挙げられる（W O 88-01

649を参照)。これらのV領域は、好ましくは、ペプチドリンカーによって連結されている。ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる(WO88-09344を参照)。

【0097】シングルチェーンFvをコードするDNAは、前記記載の再構成ヒト抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いて、PCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0098】また、一旦シングルチェーンFvをコードするDNAが作成されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、シングルチェーンFvを得ることができる。シングルチェーンFvは、抗体分子に比べ、組織への移行性が優れており、ラジオアイソトープ標識によるイメージングへの利用、および再構成ヒト抗体と同様の機能を有する治療剤としての利用が期待される。

【0099】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')₂、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvの結合活性を確認する方法として、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、キメラ抗体、再構成ヒト抗体について、酵素免疫測定法を用いる場合、抗ヒトIL-8ポリクローナル抗体をコートしたプレートにヒトIL-8を添加し、ここにヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体を産生する細胞の培養上清あるいは精製サンプルを加え、アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した適切な二次抗体を添加する。プレートのインキュベーションおよび洗浄の後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

【0100】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')₂、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvのIL-8レセプターに対するIL-8結合阻害活性は、通常のリガンドレセプター結合阻害アッセイにより評価される。例えば、好中球上のIL-8レセプターに対するIL-8の結合阻害アッセイには、ヘパリン採血などにより得られる好中球を遠心分離等の手段で分離した後、上記アッセイに好適な数の細胞懸濁液となるよう調製して用いることができる。

【0101】¹²⁵Iなどで適当に標識したIL-8と非標識のIL-8を含む溶液と適当な濃度に調製した本発明の抗体またはその断片を含む溶液を混合し、次いでこれを上記好中球懸濁液に添加する。一定時間の後、好中球を分離し、好中球上の標識された活性を測定すればよい。本発明の抗体またはその断片による好中球遊走作用(ケモタキシス; chemotaxis)の阻害能を評価するには通常知られた方法、例えばGrob, P. M.らJ. Biol. Chem., 265, 8311-8316, 1990に記載された方法を用いることができる。

【0102】市販のケモタキシスチャンバーを用いる場合、本発明の抗体またはその断片を適当な培養液で希釈した後、IL-8を加え、これをチャンバーに分注する。ついで、調製した好中球懸濁液をチャンバーに添加し、一定時間放置する。遊走する好中球は、チャンバーに装着されたフィルターに付着するので、その好中球の数を染色液あるいは蛍光抗体等の通常の方法で測定すればよい。また、顕微鏡下での肉眼による判定や機械を用いる自動測定も可能である。

【0103】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')₂、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvは、メンブレンフィルターによる濾過滅菌の後、好ましくは非経口的に、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等によりあるいは経気道的に、例えばネブライザー(nebulizer)により医薬療法剤として投与することができる。ヒトに対する投与量は、患者の状態、年齢等により異なるがおよそ1～1000mg/bodyであり、1～10mg/kg/週の分割用量を選択することができる。

【0104】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')₂、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvは、精製され結合活性を評価された後に、生理活性タンパク質の製剤化に通常用いられる方法により、医薬療法剤として製剤化される。たとえば、注射用製剤は精製されたヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')₂、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvを、溶剤、例えば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに吸着防止剤、例えば、Tween80、ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)などを加えたものであり、または使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては、糖アルコール又は糖、例えばマンニトール、ブドウ糖などをもちいることができる。

【0105】

【実施例】次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例1. ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体の変領域をコードするDNAを次の様にしてクローニングした。

【0106】1. 全RNAの調製

ハイブリドーマWS-4からの全RNAを、Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979により記載されている塩化セシウム密度勾配遠心法を修飾して調製した。すなわち、 1×10^7 個のハイブリドーマWS-4の細胞を25mlの4Mグアニジンチオシアネート (Fulka社製) 中で完全にホモジナイズさせた。ホモジネートを遠心管中の5.7M塩化セシウム溶液層上に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpmにて20℃で14時間遠心分離することによりRNAを沈澱させた。

【0107】RNA沈澱物を80%エタノールにより洗浄し、そして10mM EDTA及び0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) 200μl中に溶解し、そしてそれにProteinase (Boehringer社製) を0.5mg/mlとなるように添加した後、37℃にて30分間温浴中でインキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてRNAをエタノールで沈澱させた。次に、RNA沈澱物を1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5) 200μlに溶解した。

【0108】2. メッセンジャーRNA (mRNA) の抽出

マウスモノクローナル抗体WS-4H鎖をコードするmRNAを抽出するため、Fast Track mRNA Isolation Kit Version 3.2 (Invitrogen社製) を用いて、その指示書に記載の方法に従い、上記1. で得られた全RNAからpoly(A) ポジティブなmRNAを抽出した。

【0109】3. 一本鎖cDNAの合成

cDNA Cycle Kit (Invitrogen社製) を用いて、その指示書に記載の方法に従い、上記2. で得られた約40ngのmRNAより一本鎖cDNAを合成し、マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅に用いた。尚、マウスL鎖V領域をコードするcDNAを増幅するために、約10μgの上記全RNAより一本鎖cDNAを合成した。

【0110】4. 抗体変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

(1) マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅
PCRのためのプライマーは、配列番号: 13~24に示すMHV (Mouse Heavy Variable) プライマー1~12、及び配列番号: 25に示すM

HC (Mouse Heavy Constant) プライマー (Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

【0111】PCR溶液100μlは、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 0.1mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5mM MgCl₂, 0.001% (W/V) ゼラチン, 5ユニットのDNAポリメラーゼAmpliTaq (Perkin Elmer Cetus社)、0.25μMの配列番号: 13~24に示すMHVプライマーのうち一つと1.75μMの配列番号: 25に示すMHCプライマー及び上記3. で得られた一本鎖cDNA溶液1.5μlを含有し、MHV1~12プライマーの各々について別々に用意した。これを50μlの鉱油で覆った後、94℃の初期温度にて3分間そして次に94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。

【0112】(2) マウスL鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号: 1~11に示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー1~11、及び配列番号: 12に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

【0113】cDNAの増幅は、それぞれ0.25μMのMKVプライマー混合物と3.0μMのMKCプライマーを用いて増幅した点を除いて、前記4. (1) においてH鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により上記3. で得られた一本鎖cDNA溶液2.0μlから増幅を行なった。

【0114】5. PCR生成物の精製および断片化
前記のようにしてPCR法により増幅したH鎖V領域およびL鎖V領域それぞれのDNA断片を1.5%低融点アガロース (Sigma社製) を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。約450bp長のH鎖DNA断片と約400bp長のL鎖DNA断片を含有するアガロース片をそれぞれ切り取り、そして65℃にて5分間熔融せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び300mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) を加えた。

【0115】この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5) に溶解した。次に、10mM MgCl₂ 及び1mMジチオスレイトールを含有する10mM Tris-HCl (pH7.9) 中で5ユニットの

10

20

30

40

50

制限酵素Xma I (New England BioLabs社製)を用いて37℃にて3時間消化した。次に、40ユニットの制限酵素Sal I (宝酒造社製)により37℃にて2時間消化し、そして生ずるDNA断片を、1.5%低融点アガロース (Sigma社製)を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0116】DNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65℃にて5分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び300mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5)を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解した。こうして、マウスκ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片、及びマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片を各々得た。上記DNA断片はいずれもその5'末端にSal I接着末端を有し、そしてその3'末端にXma I接着末端を有する。

【0117】6. 連結及び形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るSal I-Xma I DNA断片約0.3μgを、Sal I、Xma I及び大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ (BAP; 宝酒造社製)で消化することにより調製したpUC19ベクター (宝酒造社製)約0.1μgと、1ユニットT4 DNAリガーゼ (GIBCO BRL社製)及び添付のバッファーを含有する反応混液中で、16℃にて4時間反応させ連結した。

【0118】次に、5μlの上記連結混合物を大腸菌DH5αのコンピテント細胞 (GIBCO BRL社製) 50μlに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで400μlの2×YT培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))を加え、37℃にて1時間インキュベートした後、50μg/mlのアンプシリン (明治製菓社製)を含有する2×YT寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0119】尚、この際選択マーカーとしてX-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, 宝酒造社製)

50μgを塗布した。この形質転換体を、50μg/mlのアンプシリンを含有する2×YT培地10ml中で37℃にて一夜培養し、そしてこの培養物から、QIAGEN plasmid mini kit (QIAGEN社製)を用いて、その指示書に記載の方法に従ってプラスミドDNAを調製した。

【0120】こうして得られた、ハイブリドーマWS-4に由来するマウスκ型L鎖V領域をコードする遺伝子含有するプラスミドをpUC-WS4-VLと命名した。大腸菌コンピテント細胞をJM109を用いた点を除いて、上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマWS-4に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子含有するプラスミドをSal I-Xma I DNA断片から作成し、そしてpUC-WS4-VHと命名した。

【0121】実施例2. DNAの塩基配列の決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、シーケンズプライマーとしてM13 Primer RVおよびM13 Primer M4 (両者とも宝酒造社製)、自動DNAシーケンサー (Applied Biosystem Inc製)およびTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc製)を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って塩基配列を決定した。プラスミドpUC-WS4-VLに含まれるマウスWS-4抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 26に示す。また、プラスミドpUC-WS4-VHに含まれるマウスWS-4抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 27に示す。

【0122】実施例3. CDRの決定

L鎖及びH鎖のV領域の基本的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク領域が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. ら、"Sequences of Proteins of Immunological Interest" U S Dept. Health and Human Services, 1991)。

【0123】この様な事実に基づき、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることにによりCDR領域を表5に示す如く決定した。

【0124】

【表5】

プラスミド	配列番号	CDR1	CDR2	CDR3
pUC-WS4-VL	26	24-34	50-56	89-97
pUC-WS4-VH	27	31-35	50-68	101-111

【0125】実施例4. クローン化cDNAの発現の確認(キメラWS-4抗体の作製)

発現ベクターの作製

キメラWS-4抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスWS-4 L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpUC-WS4-VL及びpUC-WS4-VHをPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター(前記、WO92-19759及び図1を参照のこと)に導入した。

【0126】L鎖V領域のための後方プライマー(配列番号:28)及びH鎖V領域のための後方プライマー(配列番号:29)は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M.ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)及びHindIII制限部位を有するように設計した。L鎖V領域のための前方プライマー(配列番号:30)及びH鎖V領域のための前方プライマー(配列番号:31)は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライスドナー配列及びBamHI制限部位を付加するように設計した。

【0127】20mM Tris-HCl (pH8.2)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、1% Triton X-100 100μM dNTPs、1.5mM MgCl₂、100pmole ずつの各プライマー、100ngの鋳型DNA(pUC-VL又はpUC-VH)、及び2.5UのAmpliTaq酵素を含有する100μlのPCR反応混合物を50μlの鉱油で覆い、94℃にて3分間最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを30回行い、最後に72℃にて10分間インキュベートした。

【0128】PCR生成物を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そしてL鎖V領域については、HEF発現ベクターHEF-VL-gκに、H鎖V領域についてはHEF発現ベクターHEF-VH-gγ1にそれぞれクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-chWS4L-gκ, HEF-chWS4H-gγ1と命名した。

【0129】COS細胞へのトランスフェクション

キメラWS-4抗体の一過性発現を観察するため、前記

発現ベクターをCOS細胞において試験した。HEF-chWS4L-gκならびにHEF-chWS4H-gγ1をGene Pulser装置(BioRad社製)を用いてエレクトロポレーションによりCOS細胞に同時形質転換した。各DNA(10μg)を、PBS中1×10⁷細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1.5kV、25μFの容量にてパルスを与えた。

【0130】室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、5%のγグロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液(GIBCO社製)15mlに懸濁し、組織培養シャーレに添加した。96時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、直径0.45μmのディスクフィルター(Gelman Science社製)にて濾過した。

【0131】ELISA

抗原結合測定および抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調整した。抗原結合活性測定のためのELISAプレートは次の様にして調製した。96穴プレート(Nunc社製)の各ウェルを、濃度2μg/mlで固層化バッファー(0.1M 炭酸水素ナトリウム、0.02% アジ化ナトリウム)に溶解したヤギ抗ヒトIL-8ポリクローナル抗体(R&D systems社製)100μlで固層化し、希釈バッファー(50mM Tris-HCl, pH7.2, 1%ウシ血清アルブミン(BSA), 1mM MgCl₂, 0.15M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% アジ化ナトリウム)200μlでブロッキングの後、濃度5ng/ml組換えヒトIL-8(Amersham社製)100μlを添加した。

【0132】キメラ抗体の精製サンプル、あるいはこれらを発現させたCOS細胞の培養上清を順次希釈して、各ウェルに加え、次に濃度1μg/mlのアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO社製)100μlを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液(1mg/ml p-ニトロフェニル磷酸)を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。

【0133】抗体濃度測定には、96穴プレートを濃度1μg/mlヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO社製)100μlで固層化し、ブロッキングの後、キメラ抗体の精製サンプル、あるいはこれらを発現させたCOS細胞の培養上清を順次希釈して、各ウェルに加え、次に濃度1μg/mlのアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-

10

20

30

40

50

ヒトIgG抗体(TAGO社製)100 μ lを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液(1mg/ml p-ニトロフェニル燐酸、Sigma社製)を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。その結果、キメラ抗体WS-4がIL-8に特異的に結合したことから、このキメラ抗体がマウスモノクローナル抗体WS-4のV領域の正しい構造を有することが示唆された(図2を参照のこと)。

【0134】なお、前記プラスミドHEF-chWS4L-g κ を有する大腸菌は*Escherichia coli* DH5 α (HEF-chWS4L-g κ)、および前記プラスミドHEF-chWS4H-g γ を有する大腸菌は*Escherichia coli* JM109(HEF-chWS4H-g γ)として工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成6年7月12日に各々FERM BP-4739、およびFERM BP-4740としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

【0135】実施例5. 再構成ヒトWS-4抗体の作製

再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の作製

再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域をコードするDNAを次の様にして設計した。ヒト抗体VDH26のFR1~3およびヒト抗体4B4のFR4をコードするそれぞれ既知のDNA配列をマウスWS-4抗体H鎖V領域のCDRをコードするDNA配列が連結されるように再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域をコードする全長DNAを設計した。

【0136】次に、このDNA配列のそれぞれ5'側及び3'側にHindIII認識部位/KOZAKコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライドナー配列をそれぞれ付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。こうして設計したDNA配列をほぼ均等な4本のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピューター解析した。

【0137】4本のオリゴヌクレオチド配列を配列番号:32~35に示す。これらのオリゴヌクレオチドは113~143塩基の長さを有し、隣接する2本のオリゴヌクレオチドは互いに20塩基のオーバーラップ領域を有する。4本のオリゴヌクレオチドの内HF1(配列番号:32)、HF3(配列番号:34)はセンスDNA配列を有し、そして他のHF2(配列番号:33)、HF4(配列番号:35)はアンチセンスDNA配列を有する。これらのオリゴヌクレオチドを自動DNA合成装置(Applied Biosystems社)によって合成した。

【0138】また、これら4本のオリゴヌクレオチドのPCR法によるアッセンブリーの方法を図3に記す。約

100ngずつのHF1とHF2、HF3とHF4を組み合わせて、2.5uのPfu DNAポリメラーゼを含む最終容量98 μ lのPCR反応液に添加した。94 $^{\circ}$ Cにて3分間の最初の変性の後、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間を1サイクルとし、これを2サイクル行った。

【0139】PCR反応液の半量を相互に交換したのち、さらに2サイクルのインキュベーションを行った。100pmoleずつのRVH5'プライマー(配列番号:36)及びRVH3'プライマー(配列番号:37)を外プライマーとして添加した後、PCR反応液を50 μ lの鉱油で覆い、そして94 $^{\circ}$ Cにて3分間の最初の変性の後、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間の45サイクルを行い、そして次に72 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートした。

【0140】約450塩基対のDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして次にHEF発現ベクターHEF-RVHa-g γ 1にクローニングした。EF-1プライマー(配列番号:66)およびHIPプライマー(配列番号:67)を用いてDNA配列決定の後、正しいH鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVHa-g γ 1と命名した。本プラスミドHEF-RVHa-g γ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号:38に示す。

【0141】再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の各バージョン「b」、「c」、「d」、「e」、「f」、「g」、「h」を以下のようにして作製した。バージョン「b」(RVHb)は、47位のロイシンがトリプトファンに変異するように設計した変異原プライマーLTW1(配列番号:39)およびLTW-2(配列番号:40)を用い、両端を規定するプライマーとしてはRVH5'(配列番号:36)およびRVH3'(配列番号:37)を用いて、プラスミドHEF-RVHa-g γ 1を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVHb-g γ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHb-g γ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号:41に示す。

【0142】バージョン「c」は、41位のグルタミンがプロリンに変異するように設計した変異原プライマーQTP1(配列番号:42)およびQTP2(配列番号:43)を用い、プラスミドHEF-RVHa-g γ 1を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVHc-g γ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHc-g γ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号:44に示す。

【0143】バージョン「d」は、変異原プライマーとしてQTP1およびQTP2を用い、プラスミドHEF-RVHb-g γ 1を鋳型DNAとしてプラスミドHEF

F-RVHd-g y 1を得た。本プラスミドHEF-RVHd-g y 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：45に示す。バージョン

「e」は、40位のアラニンがプロリンに変異するように設計した変異原プライマーATP1（配列番号：46）およびATP2（配列番号：47）を用い、プラスミドHEF-RVHd-g y 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHe-g y 1を得た。本プラスミドHEF-RVHe-g y 1に含まれるH鎖V領域に含まれるアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：48に示す。

【0144】バージョン「f」は、44位のグリシンがアラニンに変異するように設計した変異原プライマーGTA1（配列番号：49）およびGTA2（配列番号：50）を用い、プラスミドHEF-RVHd-g y 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHf-g y 1を得た。本プラスミドHEF-RVHf-g y 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：51に示す。

【0145】バージョン「g」は、67位のロイシンがフェニルアラニンに変異するように設計した変異原プライマーLTF1（配列番号：52）およびLTF2（配列番号：53）を用い、プラスミドHEF-RVHd-g y 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHg-g y 1を得た。本プラスミドHEF-RVHg-g y 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：54に示す。

【0146】バージョン「h」は、変異原プライマーとしてLTF1およびLTF2を用い、プラスミドHEF-RVHb-g y 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHh-g y 1を得た。本プラスミドHEF-RVHh-g y 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：55に示す。

【0147】再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の作製再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域をコードするDNAを次の様にして設計した。ヒト抗体REIのFRをコードするDNA配列とマウスWS-4抗体L鎖V領域のCDRをコードするDNA配列が連結されるように再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域をコードする全長DNAを設計した。

【0148】次に、このDNA配列のそれぞれ5'側及び3'側にHindIII認識部位/KOZAKコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライドナー配列をそれぞれ付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。こうして設計したDNA配列をほぼ均等な長さの4本のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピューター解析した。

【0149】4本のオリゴヌクレオチド配列を配列番

号：56～59に示す。これらのオリゴヌクレオチドは106～124塩基の長さを有し、隣接する2本のオリゴヌクレオチドは互いに19～23塩基のオーバーラップ領域を有する。4本のオリゴヌクレオチドの内LF1

（配列番号：56）、LF3（配列番号：58）はセンスDNA配列を有し、そして他のLF2（配列番号：57）、LF4（配列番号：59）はアンチセンスDNA配列を有する。これらオリゴヌクレオチドを前記のHF1～4と同様の方法で合成した。

【0150】アッセンブリーは、100ngずつの4種のオリゴヌクレオチド及び5uのAmpliTaqを含有する98μlのPCR混合物を、94℃にて3分間の最初の変性の後、94℃にて2分間、55℃にて2分間及び72℃にて3分間を1サイクルとし、これを2サイクル行なった。100pmoleずつのRVL5'プライマー（配列番号：60）及びRVL3'プライマー（配列番号：61）を外部プライマーとして添加した後、PCR反応液を50μlの鉱油で覆い、そして94℃にて3分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間を1サイクルとしてこれを30サイクルを行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした（図3参照）。

【0151】約400塩基対のDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして次にHEF発現ベクターHEF-VL-g κにクローニングした。EF-1プライマー（配列番号：66）およびKIPプライマー（配列番号：68）を用いてDNA配列決定の後、正しいL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVL a-g κと命名した。本プラスミドHEF-RVL a-g κに含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：62に示す。

【0152】バージョン「b」（RVLb）は、71位のフェニルアラニンがチロシンに変異するように設計した変異原プライマーFTY1（配列番号：63）およびFTY2（配列番号：64）を用い、両端を規定するプライマーとしてはRVL5'（配列番号：60）およびRVL3'（配列番号：61）を用いて、プラスミドHEF-RVL a-g κを鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVL b-g κを得た。本プラスミドHEF-RVL b-g κに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：65に示す。

【0153】再構成ヒトWS-4抗体の各鎖の抗原結合活性を評価するため、まず、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョンのための発現ベクターHEF-RVL a-g κとキメラWS-4抗体H鎖のための発現ベクターHEF-chWS4H-g y 1とによりCOS細胞を前記のようにして同時トランスフェクションし、前記

10

20

30

40

50

のようにして培養上清を回収した後、前記実施例4 E L I S Aに記載のとおりの方法を用いて、産生された抗体について産生抗体量および抗原結合活性を測定した。この結果を図4に示す。図4に示すように陽性対照としてのキメラ抗体(c h L/c h H)および再構成L鎖とキメラH鎖とからなる抗体(R V L a/c h H)との間には抗原結合性に差がないことが確認された。

【0154】同時に、キメラWS-4抗体L鎖のための発現ベクターH E F-c h W S 4 L-g κと再構成ヒトWS-4抗体H鎖の「a」バージョンとの組み合わせを評価するため、両者をC O S細胞に同時トランスフェクションし、前記実施例4 E L I S Aに記載のとおりの方法を用いて、得られた抗体について産生抗体量および抗原結合活性を測定した。その結果、この抗体(c h L/R V H a)には抗原結合活性が見られなかった(図4を参照のこと)。

【0155】前記のごとく、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)はキメラWS-4抗体L鎖と同等の結合活性を示したので、これ以後の再構成H鎖各バージョンの評価には、再構成H鎖各バージョンと再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)をC O S細胞に同時トランスフェクションすることにより行なった。

【0156】その結果、「b」、「d」、「e」、「f」、「g」、「h」の各再構成H鎖バージョンを有する抗体は、陽性対照であるキメラWS-4抗体(c h L/c h H)に匹敵する程度の抗原結合性を示し、この組み合わせがヒト抗体における機能的抗原結合部位を形成することが示唆された。しかし、産生量については、「g」バージョン(R V H g)以外はいずれもキメラWS-4抗体(c h L/c h H)より低かった。なお、H鎖バージョン「c」を有する抗体には抗原結合活性が見られなかった(図5を参照のこと)。

【0157】このことから、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)ならびに再構成ヒトWS-4抗体H鎖の「g」バージョン(R V H g)を有する抗体は、良好な抗原結合性を示す機能的抗原結合部位を再形成し、C O S細胞に同時トランスフェクションすることによりキメラWS-4抗体(c h L/c h H)に匹敵する程度の産生量を示すことが示唆された。

【0158】次に、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「b」バージョン(R V L b)を用いて、H鎖各バージョンとC O S細胞に同時トランスフェクションし、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「b」バージョン(R V L b)の評価をおこなった。その結果、再構成ヒトWS-4抗体H鎖「g」バージョンを有する抗体(R V L b/R V H g)だけが、陽性対照であるキメラWS-4抗体(c h L/c h H)に匹敵する程度の抗原結合性を示し、この組み合わせがヒト抗体における機能的抗原結合部位を形成することが示唆された。また、産生量について

も、「g」バージョン(R V H g)以外はいずれもキメラWS-4抗体(c h L/c h H)より低かった(図6を参照のこと)。

【0159】前記の評価において、キメラWS-4抗体(c h L/c h H)に匹敵する産生量とI L-8に対する結合活性を示した2種の再構成ヒト抗体(R V L a/R V H gとR V L b/R V H g)をそれぞれプロテインAカラムで精製して、実施例4 E L I S Aに記載の方法で結合活性をより正確に評価した。その結果、キメラWS-4抗体(c h L/c h H)、R V L a/R V H g抗体並びにR V L b/R V H g抗体のいずれも同程度の結合活性を示した(図7参照のこと)。

【0160】このことから、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)あるいは「b」バージョン(R V L b)と、再構成ヒトWS-4抗体H鎖の「g」バージョン(R V H g)を有する抗体は、良好な抗原結合性を示す機能的抗原結合部位を再形成し、C O S細胞に同時トランスフェクションすることによりキメラWS-4抗体(c h L/c h H)に匹敵する程度の産生量を示すことが示唆された。

【0161】再構成ヒトWS-4抗体のL鎖「a」バージョン(R V L a)と同H鎖「g」バージョン(R V H g)、または同L鎖「b」バージョン(R V L b)と同H鎖「g」バージョン(R V H g)からなる再構成ヒト抗体のI L-8レセプターに対するI L-8結合阻害活性を、リガンドレセプター結合阻害アッセイにより評価した。

【0162】健康人よりヘパリン採血した約100mlの血液を、15mlのMono-Poly分離溶液(I C N B i o m e d i c a l s社製)に35mlずつ重層し、添付の指示書に従い遠心分離をおこなってヒト好中球層を単離した。この細胞を1% B S A添加R P M I-1640培地にて洗浄した後、混入した赤血球を150mMの塩化アンモニウム溶液にて除去した。これを遠心分離した後、細胞を1% B S A添加R P M I-1640培地にて洗浄し、 2×10^7 Cells/mlの細胞濃度になるように再懸濁した。この細胞懸濁液の好中球の含有率は、サイトスピン(Shandon社)による塗抹標本をD i f f -Q u i k(ミドリ十字社製)染色して測定した結果95%以上であった。

【0163】上記好中球懸濁液を遠心分離し、結合バッファ(1% B S A及び0.1%アジ化ナトリウムを含むD-P B S)にて細胞濃度 2×10^7 Cells/mlになるように再懸濁した。この時、好中球上のF cレセプターをあらかじめ飽和する目的で、本発明のヒト抗体と同一のF c部分を有するS K 2キメラ抗体(国際特許出願出願番号P C T/J P 94/00859参照)とその抗原であるヒトI L-6をそれぞれ濃度約 $50 \mu\text{g/ml}$ および約 40ng/ml になるように添加し、氷温中で30分間インキュベートした。

【0164】¹²⁵Iで放射標識したIL-8(74TBq/mmol, Amersham社製)と未標識IL-8(Amersham社製)を各濃度が4ng/mlになるように結合バッファーにて混合し調製した。キメラWS-4抗体(c_HL/c_HH)、再構成ヒト抗体(RVLa/RVHgおよびRVLb/RVHg)、陰性対照のヒト抗体(PAESEL+LOREI社製)あるいは陽性対照のマウスWS-4抗体のそれぞれを結合バッファーにて濃度2000ng/mlから約8ng/mlまで2倍段階希釈した。IL-8溶液ならびに各抗体溶液をそれぞれ50μlずつ混合し氷温中で30分間インキュベートした。その後、上記好中球懸濁液100μlを添加し、更に15分毎に攪拌しながら氷温中で1時間インキュベートした。インキュベート後、この細胞懸濁液を200μlの20%サッカロース溶液に重層し、遠心、凍結させた。細胞に結合したIL-8を測定するため、細胞沈渣を切断し、γ-カウンター(アロカ社製)で放射活性を測定した。その結果を図8に示す。

【0165】再構成ヒトWS-4抗体のL鎖「a」バージョン(RVLa)と同H鎖「g」バージョン(RVHg)、または同L鎖「b」バージョン(RVLb)と同H鎖「g」バージョン(RVHg)を有する抗体は、IL-8レセプターに対するIL-8の結合に対して、キメラ抗体(c_HL/c_HH)と同程度の結合阻害活性を有することが明らかになった。

【0166】なお、前記プラスミドHEF-RVLa-g_Kを有する大腸菌はEscherichia coli DH5α(HEF-RVLa-g_K)、およびプラスミドHEF-RVHg-g_{Y1}を含有する大腸菌はEscherichia coli JM109(HEF-RVHg-g_{Y1})として工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成*

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGCTGCTG

40

【0170】配列番号: 2

配列の長さ: 39

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

※

配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT

39

【0171】配列番号: 3

配列の長さ: 40

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

★

配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGSCTTG

40

【0172】配列番号: 4

配列の長さ: 43

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

50

*6年7月12日に、各々FERM BP-4738および、FERM BP-4741としてブタベスト条約に基づき国際寄託された。

【0167】参考例1. ハイブリドーマWS-4の作製

抗ヒトIL-8モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒトIL-8で免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞P3X63-Ag8.653をポリエチレングリコールを用いた常法により融合して作製した。ヒトIL-8と結合する活性を指標としたスクリーニングを行い、ハイブリドーマWS-4を樹立した(Ko, Y-C. ら, J. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992)。

【0168】

【発明の効果】本発明はヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供し、この抗体においてはヒト抗体のV領域のCDRがヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは元来、抗原性が低いことから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に医学療用法用として期待される。

【0169】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 40

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: MKV1

※トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: MKV2

★トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: MKV3

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: MKV4

49

50

配列

ACTAGTCGAC ATCAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTC

43

【0173】配列番号：5

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：40

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV5

鎖の数：一本鎖

*

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTC AGGTGCAGAT TWTGAGCTTC

40

【0174】配列番号：6

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：37

10 配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV6

鎖の数：一本鎖

※

配列

ACTAGTCGAC ATCAGCTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG

37

【0175】配列番号：7

★トポロジー：直鎖状

配列の長さ：41

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV7

鎖の数：一本鎖

★

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCWTC AGATGGAGTC ACAKYYCWC G

41

【0176】配列番号：8

☆トポロジー：直鎖状

配列の長さ：41

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV8

鎖の数：一本鎖

☆

配列

ACTAGTCGAC ATGTGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G

41

【0177】配列番号：9

◆トポロジー：直鎖状

配列の長さ：35

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV9

鎖の数：一本鎖

◆30

配列

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

35

【0178】配列番号：10

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：37

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV10

鎖の数：一本鎖

*

配列

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGC TATTCT

37

【0179】配列番号：11

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：38

40 配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKV11

鎖の数：一本鎖

※

配列

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTCC

38

【0180】配列番号：12

★トポロジー：直鎖状

配列の長さ：27

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：MKC

鎖の数：一本鎖

★

配列

GGATCCCCGG TGGATGCTGC GAAGATG

27

51

【0181】配列番号：13

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV1

*

配列

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGTCAT STTCTTC

37

【0182】配列番号：14

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV2

※10

配列

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

36

【0183】配列番号：15

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV3

★

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGWTCT GCTTAACTG GGTTTT

37

【0184】配列番号：16

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆ トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV4

☆

配列

ACTAGTCGAC ATGRACTTTG GGYTCAGCTT GRITT

35

【0185】配列番号：17

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV5

◆

配列

ACTAGTCGAC ATGCACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCCTT

40

【0186】配列番号：18

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV6

*

配列

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC

37

【0187】配列番号：19

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV7

※40

配列

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT

36

【0188】配列番号：20

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV8

★

配列

ACTAGTCGAC ATGAGACTGC TGATTCTTTT GTG

33

【0189】配列番号：21

配列の長さ：40

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

* 配列の名称：MHV9

*

配列

ACTAGTCGAC ATCGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG

40

【0190】配列番号：22

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV10

※

配列

ACTAGTCGAC ATGGCCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG

37

【0191】配列番号：23

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV11

★

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTTG GGCTGATTTT TTTTATTG

38

【0192】配列番号：24

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV12

☆20

配列

ACTAGTCGAC ATGATGGTGT TAAGTCTTCT GTACCTG

37

【0193】配列番号：25

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHC

◆

配列

GGATCCCGGG CCACTGGATA GACAGATG

28

【0194】配列番号：26

配列の長さ：382

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の名称：WS4VL

* 起源

30 生物名：マウス

直接の起源

クローン：pUC-WS4-VL

特徴： 1..60 sig peptide

61..382 mat peptide

*

配列

ATG AGT GTG CTC ACT CAG GTC CTG GGC TTG CTG CTC CTG TGG CTT ACA

48

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

-20 -15 -10 -5

GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT

96

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

-1 1 5 10

GCA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA AGT GAG ATT

144

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile

15 20 25

ATT TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAA TCT CCT

192

Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro

30 35 40

CAG CTC CTG GTC TAT AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGT GTG TCA TCA

240

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser

(29)

特開平8-217799

55 56

45 50 55 60

AGC TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA CAG TTT TCT CTG CGG ATC AGC 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Ser

65 70 75

AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GGC AGT TAT TAC TGT CAA CAT CAT TTT 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Phe

80 85 90

GGT TTT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA CTC AAA C 382

Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

95 100 105

【0195】配列番号：27

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の名称：WS4VH

* 起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：pUC-WS4-VH

特徴：1..57 sig peptide

58..424 mat peptide

*

配列

ATG AAG TTG TGG TTA AAC TGG GTT TTT CTT CTG ACA CTT TTA AAT GGT 48

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

-19 -15 -10 -5

ATC CAG TGT CAG CTG AAA CTG GTC GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATA CAG 96

Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GAT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GTA ACC TCT GGC TTC ACC TTC 144

Pro Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGA AAG GCA CTT 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTC GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

65 70 75

CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG AGA GGT GAG GAC AGT 336

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Gly Glu Asp Ser

80 85 90

GCC ACT TAT TAC TGT GCA CGA GAG AAC TAT AGG TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAA GGC ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110 115 120

【0196】配列番号：28

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：chVL後方プライマー

※

配列

57	ACAAAGCTTC CACCATGAGT GTGCTCACTC AGGT	58	34
【0197】配列番号：29		※トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：37		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：chVH後方プライマー	
鎖の数：一本鎖	*		
配列			
GATAAGCTTC CACCATGAAG TTGTGCTTAA ACTGGCT			37
【0198】配列番号：30		※トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：37		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		10 配列の名称：chVL前方プライマー	
鎖の数：一本鎖	※		
配列			
CTTGGATCCA CTCACGTTTG ACTCCAGCT TGGTGCC			37
【0199】配列番号：31		★トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：37		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：chVH前方プライマー	
鎖の数：一本鎖	★		
配列			
GTCCGATCCA CTCACCTGCA GAGACAGTGA CCAGAGT			37
【0200】配列番号：32		20☆トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：137		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：HF1	
鎖の数：一本鎖	☆		
配列			
TAAGCTTCCA CCATGGAGTT TGGGCTGAGC TGGCTTTTCC TTGTTGCTAT			50
TTTAAAGGGT GTCCAGTGTG AAGTGCAGCT GTTGGAGTCT GGGGGAGGCT			100
TGGTCCAGCC TGGGGTTCT CTGAGACTCT CATGTGC			137
【0201】配列番号：33		◆トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：143		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		30 配列の名称：HF2	
鎖の数：一本鎖	◆		
配列			
GCACTGTA CTCTTGTGTA ACCATTGGCT TTGTTTCTAA TGAGACCCAC			50
CAACTCTAGC CCTTCCCTT GAGCTTGGCG GACCCAGCTC AGGTAGTAAT			100
CAGTGAAGGT GAATCCAGAG GCAGCACATG ACACTCTCAG AGA			143
【0202】配列番号：34		*トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：113		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：HF3	
鎖の数：一本鎖	*		
配列			
TACACAAGAG AGTACAGTGC ATCTGTGAAG GGCAGACTTA CCATCTCAAG			50
AGAAGATTCA AAGAACACCG TGTATCTGCA AATGAGCAGC CTGAAAACCG			100
AAGACTTGGC CGT			113
【0203】配列番号：35		※トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：117		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：HF4	
鎖の数：一本鎖	※		
配列			
TCCGATCCAC TCACCTGAGG AGACGGTGAC CAGGGTTCCC TGGCCCCAGT			50
AAGCAAGCTC TACGTCTAG CCATAGTTCT CTCTAGCACA GTAATACACG			100

59

60

GCCAAGTCTT CGGTTTT

117

【0204】配列番号：36

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVH 5' プライマー

*

配列

GATAAGCTTC CACCATGGAG TTTGGGCTGA GCTGGGT

37

【0205】配列番号：37

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

10 配列の名称：RVH 3' プライマー

※

配列

GTCGGATCCA CTCACCTGAG GAGACGGTGA C

31

【0206】配列番号：38

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHa

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

★ クローン：HEF-RVHa-gyl

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

アミノ酸 36-49: FR2

アミノ酸 50-68: CDR2

20 アミノ酸 69-100: FR3

アミノ酸 101-111: CDR3

アミノ酸 112-122: FR4

★

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

CTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGC AAA GGC CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TTG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Leu Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

	61		62
	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	110 115 120		
【0207】配列番号：39		*トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：34		配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：LTW1	
鎖の数：一本鎖	*		
配列			
	GGCTAGAGTG GGTGGTCTC ATTAGAAACA AAGC		34
【0208】配列番号：40		*トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：36		10 配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸		配列の名称：LTW2	
鎖の数：一本鎖	※		
配列			
	GAGACCCACC CACTCTAGCC CTTCCCTTG AGCTTG		36
【0209】配列番号：41		★クローン：HEF-RVHb-gy1	
配列の長さ：424		アミノ酸 -19--1：leader	
配列の型：核酸		アミノ酸 1-30：FR1	
鎖の数：二本鎖		アミノ酸 31-35：CDR1	
トポロジー：直鎖状		アミノ酸 36-49：FR2	
配列の種類：合成DNA	20	アミノ酸 50-68：CDR2	
配列の名称：RVHb		アミノ酸 69-100：FR3	
起源		アミノ酸 101-111：CDR3	
生物名：マウス及びヒト		アミノ酸 112-122：FR4	
直接の起源	★		
配列			
ATG GAG TTT GCG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT			48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly			
-19 -15 -10 -5			
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GCG GGA GGC TTG CTC CAG			96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln			
-1 1 5 10			
CCT GCG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC			144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
15 20 25			
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GCG AAA GCG CTA			192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu			
30 35 40 45			
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG			240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu			
50 55 60			
TAC AGT GCA TCT CTG AAG GCG AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA			288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser			
65 70 75			
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG			336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu			
80 85 90			
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT			384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu			
95 100 105			

(33)

特開平8-217799

63

64

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G

424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0210】配列番号：42

*トポロジー：直鎖状

配列の長さ：32

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：QTP1

鎖の数：一本鎖

*

配列

TGGGTCCGCC AAGCTCCAGG GAAAGGGCTA GA

32

【0211】配列番号：43

10※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：32

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：QTP2

鎖の数：一本鎖

※

配列

TCTAGCCCTT TCCCTGGAGC TTGGCGGACC CA

32

【0212】配列番号：44

★クローン：HEF-RVHc-gyl

配列の長さ：424

アミノ酸 -19--1: leader

配列の型：核酸

アミノ酸 1-30: FR1

鎖の数：二本鎖

アミノ酸 31-35: CDR1

トポロジー：直鎖状

20 アミノ酸 36-49: FR2

配列の種類：合成DNA

アミノ酸 50-68: CDR2

配列の名称：RVHc

アミノ酸 69-100: FR3

起源

アミノ酸 101-111: CDR3

生物名：マウス及びヒト

アミノ酸 112-122: FR4

直接の起源

★

配列

ATG GAG TTT GGC CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGC GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGC GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGC AAA GGC CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TTG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Leu Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT CTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

(34)

特開平8-217799

65.

66

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G

424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0213】配列番号：45

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHd

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

* クローン：HEF-RVHd-gy1

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

アミノ酸 36-49: FR2

アミノ酸 50-68: CDR2

10 アミノ酸 69-100: FR3

アミノ酸 101-111: CDR3

アミノ酸 112-122: FR4

*

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

CTC CAG TGT GAA CTG CAG CTG TTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC CTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0214】配列番号：46

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：ATP1

※

配列

TGGGTCCGCC AACCTCCAGG GAAAGG

26

【0215】配列番号：47

配列の長さ：26

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCTTTCCCTG GAGGTTGGCG GACCCA

【0216】配列番号：48

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHe

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

* 配列の名称：ATP2

*

26

※クローン：HEF-RVHe-gyl

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

アミノ酸 36-49: FR2

10 アミノ酸 50-68: CDR2

アミノ酸 69-100: FR3

アミノ酸 101-111: CDR3

アミノ酸 112-122: FR4

※

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GCA GCC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA CCT CCA GGC AAA GGC CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT CTG AAG GCC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC CTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0217】配列番号：49

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CAAGCTCCAG GCAAAGCGCT AGACTGGCT

【0218】配列番号：50

配列の長さ：29

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：GTA1

★

29

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

* 配列の名称：GTA2

*

配列

ACCCACTCTA GCGCTTCCG TGGAGCTTG

29

【0219】配列番号：51

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHf

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

※ クローン：HEF-RVHf-gyl

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

アミノ酸 36-49: FR2

10 アミノ酸 50-68: CDR2

アミノ酸 69-100: FR3

アミノ酸 101-111: CDR3

アミノ酸 112-122: FR4

※

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG CAG TCT GCG GCA GCC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GCG AAA GCG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT CTG AAG GCC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0220】配列番号：52

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：LTF1

★

配列

GTGAAGGCCA GATTACCAT CTC

23

【0221】配列番号：53

50 配列の長さ：23

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA
配列の名称：LTF2

*

配列

GAGATGGTAA ATCTGCCCTT CAC

【0222】配列番号：54

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHg

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

23

※ クローン：HEF-RVHg-gyl

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

10 アミノ酸 36-49: FR2

アミノ酸 50-68: CDR2

アミノ酸 69-100: FR3

アミノ酸 101-111: CDR3

アミノ酸 112-122: FR4

※

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA TTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0223】配列番号：55

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHh

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVHh-gyl

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

50 アミノ酸 31-35: CDR1

(38)

特開平8-217799

73
 アミノ酸 36-49:FR2
 アミノ酸 50-68:CDR2
 アミノ酸 69-100:FR3

74
 *アミノ酸 101-111:CDR3
 アミノ酸 112-122:FR4

*

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
-1 1 5 10	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
15 20 25	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
50 55 60	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA TTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
65 70 75	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
80 85 90	
GCC CTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
95 100 105	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0224】配列番号: 56

配列の長さ: 124

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

※トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: L F 1

※

配列

TTGAAGCTTC CACCATGGGA TGGAGCTGTA TCATCCTCTT CTTGGTAGCA	50
ACAGCTACAG GTGTCCACTC CGACATCCAG ATGACCCAGA GCCCAAGCAG	100
CCTGAGCGCC AGCGTAGGTG ACAG	124

【0225】配列番号: 57

配列の長さ: 122

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

★トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: L F 2

★

配列

GCATTGTAGA TCAGCAGCTT TGGAGCCTTT CCTGGCTTCT GCTGGTACCA	50
TGCTAAATAA CTGTAATAA TCTCGCTTGC TCGACAGGTG ATGCTCACTC	100
TGTCACCTAC GCTGGCGCTC AG	122

【0226】配列番号: 58

配列の長さ: 121

配列の型: 核酸

50 鎖の数: 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACCTGCTGAT CTACAATGCA AAAACCTTAG CAGATGGAGT GCCAAGCAGA

50

TTCAGCGGTA GCGGTAGCGG TACCGACTTC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT

100

CCAGCCAGAG GACATCGCTA C

121

【0227】配列番号：59

配列の長さ：106

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTAGGATCCA CTCACGTTTG ATTTGACCT TGCTCCCTTG GCCGAACGTC

50

CGAGGAAAAC CAAAATGATG TTGCCAGTAG TAGGTAGCGA TGTCTCTGCG

100

CTGGAG

106

【0228】配列番号：60

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

TTGAAGCTTC CACCATGGGA

20

【0229】配列番号：61

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GTAGGATCCA CTCACGTTTG

20

【0230】配列番号：62

配列の長さ：379

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVLa

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC 96

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1 5 10

AGC GTA GGT GAC AGA CTG ACC ATC ACC TGT CGA GCA AGC GAG ATT ATT 144

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile

15 20 25

TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG 192

Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

30 35 40 45

CTG CTG ATC TAC AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGA GTG CCA AGC AGA 240

* 配列の名称：LF3

*

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：LF4

※10

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVL5'

★

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVL3'

☆

◆クローン：HEF-RVLa-gκ

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-23: FR1

30 アミノ酸 24-34: CDR1

アミノ酸 35-49: FR2

アミノ酸 50-56: CDR2

アミノ酸 57-88: FR3

アミノ酸 89-97: CDR3

アミノ酸 98-107: FR4

◆

77	Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg	78
50	55	60
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288	
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser		
65	70	75
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAT CAT TTT GGT	336	
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly		
80	85	90
TTT CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA C	379	
Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
95	100	105
【0231】配列番号：63	* トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：38	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	配列の名称：FTY1	
鎖の数：一本鎖	*	
配列		
AGCGGTAGCG GTACCGACTA CACCTTCACC ATCAGCAG	38	
【0232】配列番号：64	* トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：38	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	20 配列の名称：FTY2	
鎖の数：一本鎖	※	
配列		
CTGCTGATGG TGAAGGTGTA GTCGGTACCG CTACCGCT	38	
【0233】配列番号：65	★ クローン：HEF-RVLb-gκ	
配列の長さ：379	アミノ酸 -19--1：leader	
配列の型：核酸	アミノ酸 1-23：FR1	
鎖の数：二本鎖	アミノ酸 24-34：CDR1	
トポロジー：直鎖状	アミノ酸 35-49：FR2	
配列の種類：合成DNA	アミノ酸 50-56：CDR2	
配列の名称：RVLb	30 アミノ酸 57-88：FR3	
起源	アミノ酸 89-97：CDR3	
生物名：マウス及びヒト	アミノ酸 98-107：FR4	
直接の起源	★	
配列		
ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
-19 -15 -10 -5		
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATC ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96	
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
-1 1 5 10		
AGC GTA GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT CGA GCA AGC GAG ATT ATT	144	
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile		
15 20 25		
TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192	
Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
30 35 40 45		
CTG CTC ATC TAC AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGA GTG CCA AGC AGA	240	
Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg		
50 55 60		
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TAC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288	

79
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser
65 70 75
CTC CAG CCA GAC GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAT CAT TTT GGT 336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly
80 85 90
TTT CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA C 379
Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105

【0234】配列番号：66

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CAGACAGTGG TTCAAAGT

【0235】配列番号：67

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GCCCCAAAGC CAAGGTC

【0236】配列番号：68

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

AACTCAATGC TTTAGGCAAA

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、それぞれ本発明の抗体のL鎖およびH鎖の発現のために有用な、ヒト・エロンゲーション・ファクター-1 α (HEF-1 α) プロモーター/エンハンサー系を含んで成る発現ベクターHEF-VL-g κ およびHEF-VH-g γ 1を示す。

【図2】図2は、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体(cHL/cHH)のヒトIL-8に対する結合能の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

【図3】図3は、本発明の再構成ヒトWS-4抗体のH鎖V領域の第一バージョン「a」(RVHa)、および再構成ヒトWS-4抗体のL鎖V領域の第一バージョン「a」(RVLa)の各アミノ酸配列をコードするDNAを構築するためのダイアグラムである。

【図4】図4は、本発明の再構成ヒトWS-4抗体のL鎖V領域(RVLa)ならびにH鎖V領域(RVHa)を、それぞれキメラWS-4抗体H鎖V領域(cHH)ならびにキメラWS-4抗体L鎖V領域(cHL)とCOS細胞に発現させ、ヒトIL-8に対する結合能と産生量を、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体(cHL/cHH)と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

*トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：合成DNA

配列の名称：EF1

*

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：HIP

※

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：KIP

★

【図5】図5は、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のRVLaを含んでなる8種の再構成ヒトWS-4抗体(RVLa/RVHa, RVLa/RVHb, RVLa/RVHc, RVLa/RVHd, RVLa/RVHe, RVLa/RVHf, RVLa/RVHg, RVLa/RVHh)のヒトIL-8に対する結合能と産生量を、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体(cHL/cHH)と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

【図6】図6は、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のRVLbを含んでなる8種の再構成ヒトWS-4抗体(RVLb/RVHa, RVLb/RVHb, RVLb/RVHc, RVLb/RVHd, RVLb/RVHe, RVLb/RVHf, RVLb/RVHg, RVLb/RVHh)のヒトIL-8に対する結合能と産生量を、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体(cHL/cHH)と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

【図7】図7は、精製した本発明の再構成ヒトWS-4抗体RVLa/RVHg並びにRVLb/RVHgのヒトIL-8に対する結合能を、精製した本発明のキメラWS-4抗体(cHL/cHH)と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

【図8】図8は、精製した本発明の再構成ヒト型化抗体

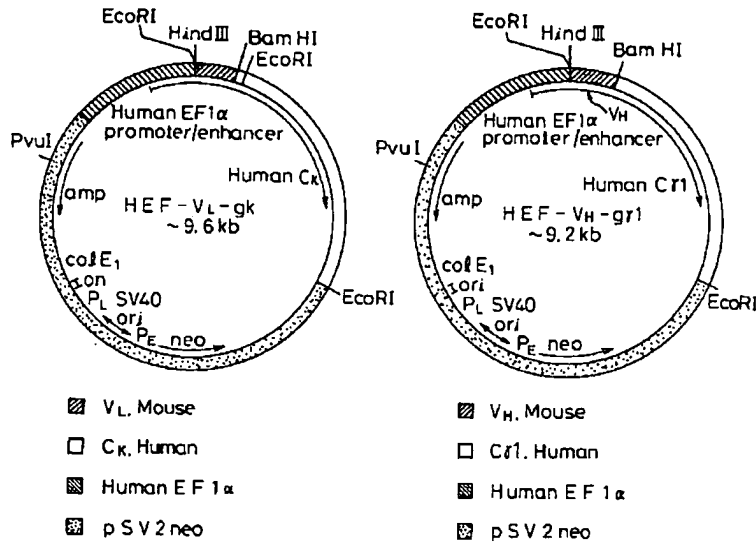
81

82

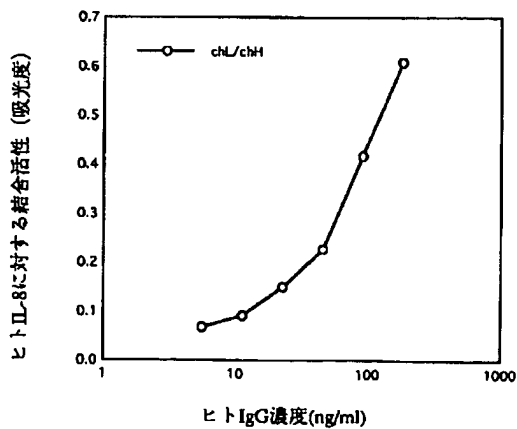
RVL a/RVHg ならびに RVL b/RVHg の IL-8 レセプターに対する IL-8 の結合阻害活性をマウス WS-4 抗体ならびに本発明のキメラ WS-4 抗体 *

(chL/chH) と比較するための、リガンドレセプター結合阻害アッセイの結果を示すグラフである。

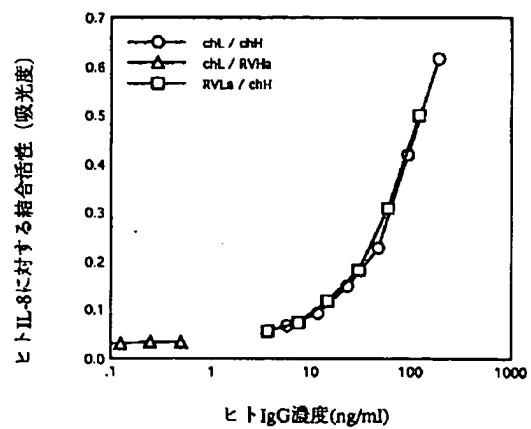
【図 1】



【図 2】

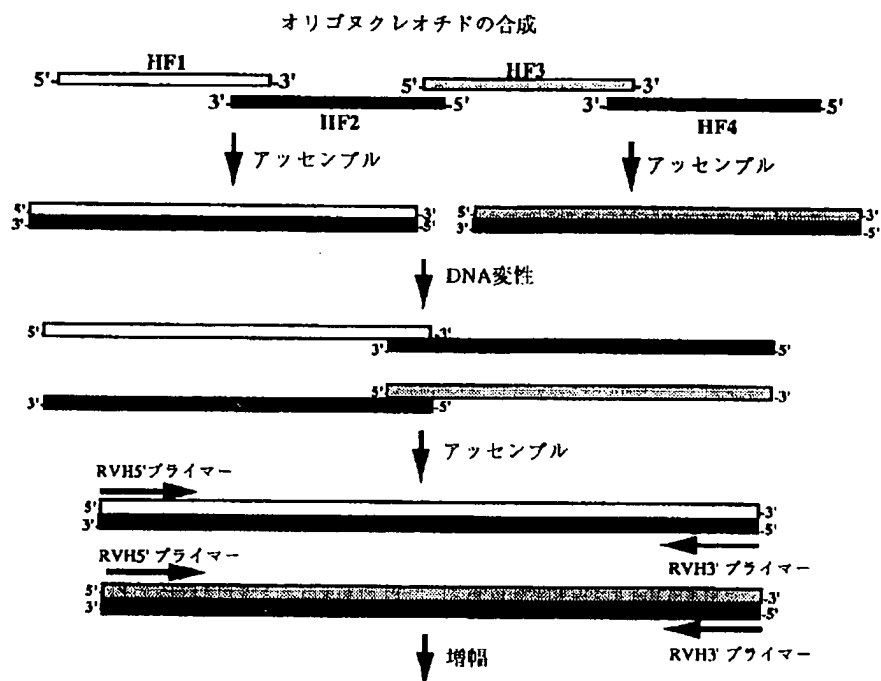


【図 4】

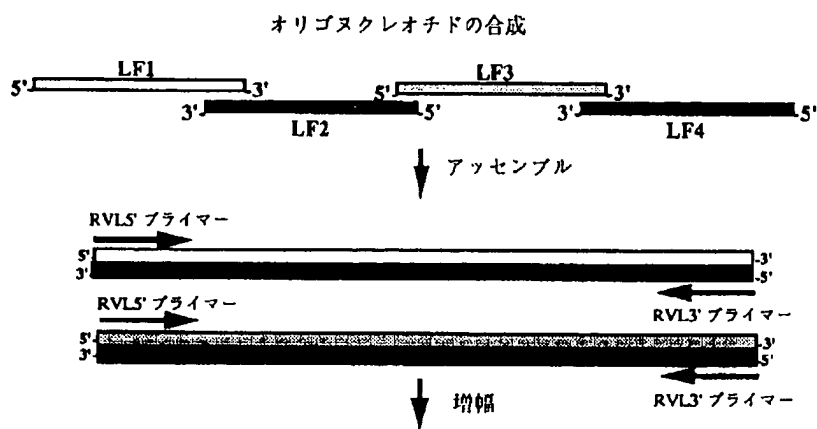


【図3】

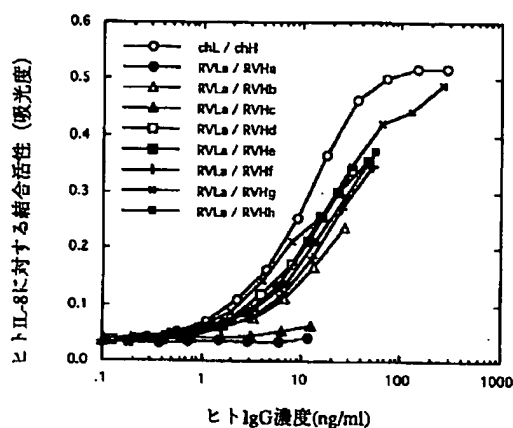
A. 再構成ヒト抗体H鎖V領域をコードするDNAの構築



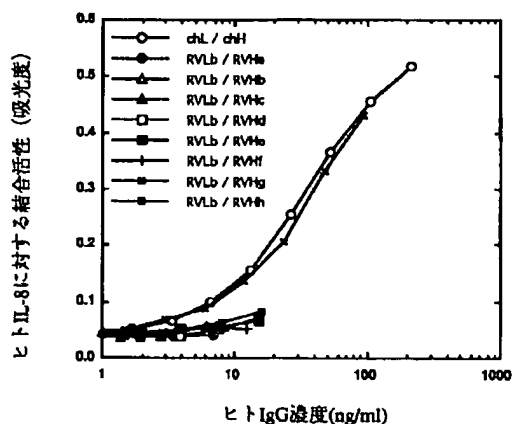
B. 再構成ヒト抗体L鎖V領域をコードするDNAの構築



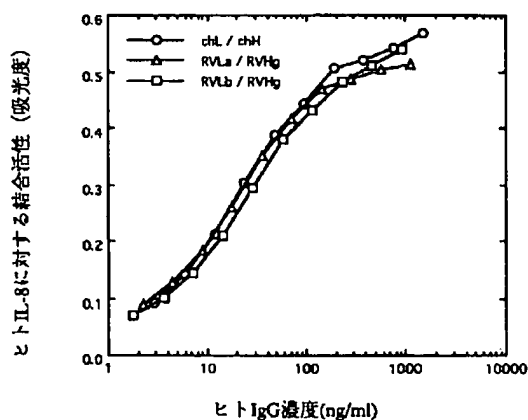
【図5】



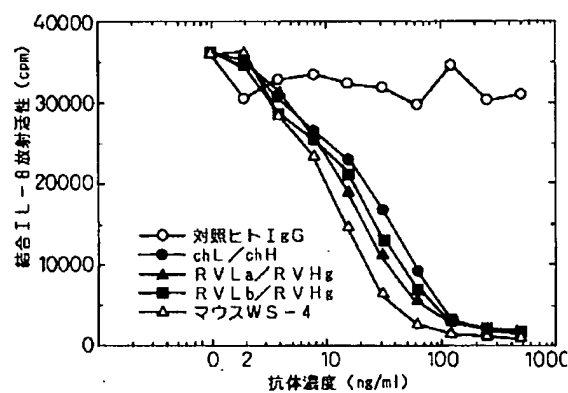
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A		A 6 1 K 39/395	A B N
C 1 2 P 21/08				A B S U
// A 6 1 K 39/395	A B E	9281-4B	C 1 2 N 5/00	B
	A B N	9162-4B	15/00	C
	A B S	9162-4B		Z N A A
(C 1 2 N 5/10				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				

(72)発明者 佐藤 功
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内

(72)発明者 土屋 政幸
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内

(72)発明者 山崎 達美
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
製薬株式会社内

A-12

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-092500

(43)Date of publication of application : 06.04.1999

(51)Int.Cl.

C07K 16/46
A61K 39/395
C07H 21/04
C07K 16/18
C07K 16/26
C12N 1/21
C12N 5/10
C12N 15/02
C12N 15/09
C12P 21/08
// A61K 38/00
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 5/10
C12R 1:91)
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 09-258739

(71)Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 24.09.1997

(72)Inventor : SATO ISAO

WAKAHARA YUJI

YABUTA HISAHIRO

(30)Priority

Priority number : 08255196 Priority date : 26.09.1996 Priority country : JP

09214168

24.07.1997

JP

(54) ANTIBODY TO HUMAN PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new antibody having a chimera L-strand including a human antibody L-strand C-domain and a mouse anti-human parathyroid hormone-related peptide monoclonal antibody L-strand V-domain, low in antigenicity, and useful for e.g. hypercalcemia and hypophosphatemia.

SOLUTION: This new antibody is composed of a chimera L-strand including a human antibody L-strand C-domain and a mouse monoclonal antibody L-strand V-domain to human parathyroid hormone related peptide, and a chimera H-strand including a human antibody H-

strand C-domain and a mouse monoclonal antibody H-strand V-domain to the human parathyroid hormone-related peptide. This new antibody is low in antigenicity in humans, and useful as, e.g. an inhibitor for hypercalcemia involved in malignant tumors or an improver for hypophosphatemia such as hypophosphatemic rachitis. This new antibody is obtained by ligating a cloned mouse V-domain sequence with a human antibody C-domain sequence integrated into an expression vector followed by transferring the ligation product into host cells and then expressing it.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-92500

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 0 7 K 16/46		C 0 7 K 16/46
A 6 1 K 39/395	A D U	A 6 1 K 39/395 A D U N
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04 B
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18
16/26		16/26
審査請求 未請求 請求項の数84 O L (全 73 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平9-258739	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 9月24日	(72) 発明者	佐藤 功 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願平8-255196	(72) 発明者	若原 裕二 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
(32) 優先日	平8(1996) 9月26日	(72) 発明者	薮田 尚弘 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(31) 優先権主張番号	特願平9-214168		
(32) 優先日	平9(1997) 7月24日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体

(57) 【要約】

【課題】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体の提供。

【解決手段】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体、該抗体をコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターにより形質転換された形質転換体、該抗体の製造方法、及び該抗体の用途。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト抗体の L 鎖 C 領域、及びヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域を含むキメラ L 鎖。

【請求項 2】 L 鎖 V 領域が配列番号 45 で表されるアミノ酸配列を含むものである請求項 1 記載のキメラ L 鎖。

【請求項 3】 C 領域が C λ 領域である請求項 1 記載のキメラ L 鎖。

【請求項 4】 ヒト抗体の H 鎖 C 領域、及びヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を含むキメラ H 鎖。

【請求項 5】 H 鎖 V 領域が配列番号 46 で表されるアミノ酸配列を含むものである請求項 4 記載のキメラ H 鎖。

【請求項 6】 C 領域が C γ 1 領域である請求項 4 記載のキメラ H 鎖。

【請求項 7】 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のキメラ L 鎖、及び請求項 4～6 のいずれか 1 項に記載のキメラ H 鎖を含む、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するキメラモノクローナル抗体。

【請求項 8】 ヒト抗体の L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 1～4、及びヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の相補性決定領域 1～3 を含む、ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域を含むポリペプチド。

【請求項 9】 相補性決定領域 1～3 がそれぞれ配列番号 59～61 で表されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 10】 フレームワーク領域 1～3 がそれぞれヒト抗体 HSU03868 のフレームワーク領域 1～3 由来のものであり、かつ、フレームワーク領域 4 がヒト抗体 S25755 のフレームワーク 4 由来のものである、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 11】 フレームワーク領域 1～3 がそれぞれヒト抗体 HSU03868 のフレームワーク領域 1～3 と実質的に同一のものであり、かつ、フレームワーク領域 4 がヒト抗体 S25755 のフレームワーク領域 4 と実質的に同一のものである、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 12】 フレームワーク領域中の Kabat の規定による第 36 番目のアミノ酸がチロシンであり、かつ、同第 49 番目のアミノ酸がアスパラギン酸である、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 13】 配列番号 48～51 で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 12 記載のポリペプチド。

【請求項 14】 フレームワーク領域中の Kabat の規定による第 45 番目のアミノ酸がリジンであり、かつ、同第 87 番目のアミノ酸がイソロイシンである、請求項 8 記載のポリペプチド。

【請求項 15】 配列番号 52～55 で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 14 記載のポリペプチド。

【請求項 16】 ヒト抗体の H 鎖 V 領域のフレームワー

ク領域 1～4、及びヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の相補性決定領域 1～3 を含む、ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域を含むポリペプチド。

【請求項 17】 相補性決定領域 1～3 が、それぞれ配列番号 62～64 で表されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 16 記載のポリペプチド。

【請求項 18】 フレームワーク領域 1～4 がヒトサブグループ III のヒト抗体のフレームワーク領域 1～4 に由来するものである、請求項 16 記載のポリペプチド。

【請求項 19】 フレームワーク領域 1～4 がそれぞれヒト抗体 S31679 のフレームワーク領域 1～4 に由来するものである、請求項 16 記載のポリペプチド。

【請求項 20】 フレームワーク領域 1～4 がそれぞれヒト抗体 S31679 のフレームワーク領域 1～4 と実質的に同一のものである、請求項 16 記載のポリペプチド。

【請求項 21】 配列番号 56 で表されるアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体の H 鎖 V 領域を含むポリペプチド。

【請求項 22】 ヒト抗体の L 鎖 C 領域を含むポリペプチド、及び請求項 8～15 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体の L 鎖。

【請求項 23】 C 領域が C λ 領域であり、フレームワーク領域 1～3 がそれぞれヒト抗体 HSU03868 のフレームワーク領域 1～3 と実質的に同一のものであり、フレームワーク領域 4 がヒト抗体 S25755 のフレームワーク領域 4 と実質的に同一のものであり、及び相補性決定領域 1～3 のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号 59～61 で表されるものである、請求項 22 記載のヒト型化抗体の L 鎖。

【請求項 24】 ヒト抗体の H 鎖 C 領域を含むポリペプチド、及び請求項 16～21 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体の H 鎖。

【請求項 25】 C 領域が C λ 1 領域であり、フレームワーク領域 1～4 がそれぞれヒト抗体 HSGIII のフレームワーク領域 1～4 由来のものであり、及び相補性決定領域 1～3 がそれぞれ配列番号 62～64 で表されるアミノ酸配列を含むものである、請求項 24 記載のヒト型化抗体の H 鎖。

【請求項 26】 請求項 22 又は 23 記載のヒト型化抗体の L 鎖、及び請求項 24 又は 25 記載のヒト型化抗体の H 鎖を含む、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体。

【請求項 27】 1.86×10^{-7} [M] 以下の解離定数を有する、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体。

【請求項 28】 1.22×10^{-1} [1/Sec] 以下の解離速度定数を有する、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体。

【請求項 29】 6.55×10^4 [1/M.Sec] 以上の結合速度定数を有する、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対

する抗体。

【請求項30】 1.22×10^{-1} [1/Sec]以下の解離速度定数及び 6.55×10^4 [1/M.Sec]以上の結合速度定数を有する、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体。

【請求項31】 解離定数が、表面プラズモン共鳴センサーにより測定されるものである請求項27記載の抗体。

【請求項32】 解離速度定数が、表面プラズモン共鳴センサーにより測定されるものである請求項28又は30記載の抗体。

【請求項33】 結合速度定数が、表面プラズモン共鳴センサーにより測定されるものである請求項29又は30記載の抗体。

【請求項34】 解離定数が 1.02×10^{-11} ～ 1.86×10^{-7} [M]である請求項27記載の抗体。

【請求項35】 解離定数が 1.02×10^{-10} ～ 1.86×10^{-8} [M]である請求項27記載の抗体。

【請求項36】 解離定数が 1.34×10^{-10} ～ 3.58×10^{-10} [M]である請求項27記載の抗体。

【請求項37】 解離速度定数が 7.38×10^{-6} ～ 1.22×10^{-1} [1/Sec]である請求項28記載の抗体。

【請求項38】 解離速度定数が 7.38×10^{-5} ～ 1.22×10^{-2} [1/Sec]である請求項28記載の抗体。

【請求項39】 解離速度定数が 1.66×10^{-4} ～ 3.16×10^{-1} [1/Sec]である請求項28記載の抗体。

【請求項40】 解離速度定数が 2.32×10^{-4} [1/Sec]である請求項28記載の抗体。

【請求項41】 結合速度定数が 6.55×10^4 ～ 1.24×10^7 [1/M.Sec]である請求項29記載の抗体。

【請求項42】 結合速度定数が 6.55×10^5 ～ 1.24×10^6 [1/M.Sec]である請求項29記載の抗体。

【請求項43】 結合速度定数が 7.23×10^5 ～ 1.03×10^6 [1/M.Sec]である請求項29記載の抗体。

【請求項44】 結合速度定数が 1.03×10^6 [1/M.Sec]である請求項29記載の抗体。

【請求項45】 2.32×10^{-4} ～ 3.16×10^{-1} [1/Sec]の解離速度定数及び 0.883×10^6 ～ 1.03×10^6 [1/M.Sec]の結合速度定数を有する、ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体。

【請求項46】 抗体が、ヒト抗体、ヒト型化抗体、キメラ抗体又はプライマタイズド抗体である請求項27～45のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項47】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項48】 L鎖V領域が配列番号45で表されるアミノ酸配列を含むものである請求項47記載のDNA。

【請求項49】 L鎖V領域をコードする塩基配列が配列番号65で表されるものである請求項47記載のDNA。

【請求項50】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項51】 H鎖V領域が配列番号46で表されるアミノ酸配列を含むものである請求項50記載のDNA。

【請求項52】 H鎖V領域をコードする塩基配列が配列番号57で表されるものである請求項50記載のDNA。

【請求項53】 請求項1～3のいずれか1項に記載のキメラL鎖をコードするDNA。

【請求項54】 キメラL鎖をコードするDNAが配列番号65で表される塩基配列を含むものである請求項53記載のDNA。

【請求項55】 請求項4～6のいずれか1項に記載のキメラH鎖をコードするDNA。

【請求項56】 キメラH鎖をコードするDNAが配列番号57で表される塩基配列を含むものである請求項55記載のDNA。

【請求項57】 請求項8～15のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項58】 配列番号66～74で表されるいずれかの塩基配列を含む、請求項57記載のDNA。

【請求項59】 請求項16～21のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項60】 配列番号58で表される塩基配列を含む、請求項59記載のDNA。

【請求項61】 請求項22又は23記載のヒト型化抗体のL鎖をコードするDNA。

【請求項62】 配列番号47～55で表されるいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、ヒト型化抗体のL鎖DNA。

【請求項63】 ヒト型化抗体のL鎖DNAが、配列番号66～74で表されるいずれかの塩基配列を含むものである請求項62記載のDNA。

【請求項64】 請求項24又は25記載のヒト型化抗体のH鎖をコードするDNA。

【請求項65】 配列番号56で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、ヒト型化抗体のH鎖DNA。

【請求項66】 ヒト型化抗体のH鎖DNAが、配列番号58で表される塩基配列を含むものである請求項65記載のDNA。

【請求項67】 請求項47～66のいずれか1項に記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項68】 請求項67記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項69】 請求項47～49及び53～54のいずれか1項に記載のDNAを含む発現ベクター、並びに請求項50～52及び55～56のいずれか1項に記載のDNAを含む発現ベクターにより形質転換された形質

転換体を培養し、得られる培養物からヒト副甲状腺関連ペプチドに対するキメラ抗体を採取することを特徴とするヒト副甲状腺関連ペプチドに対するキメラ抗体の製造方法。

【請求項70】 請求項57～58及び61～63のいずれか1項に記載のDNAを含む発現ベクター、並びに請求項59～60及び64～65のいずれか1項に記載のDNAを含む発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、得られる培養物からヒト副甲状腺関連ペプチドに対するヒト型化抗体を採取することを特徴とするヒト副甲状腺関連ペプチドに対するヒト型化抗体の製造方法。

【請求項71】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項72】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体を有効成分として含む高カルシウム血症抑制剤。

【請求項73】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体を有効成分として含む、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症抑制剤。

【請求項74】 悪性腫瘍が、膵臓癌、肺癌、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、歯肉癌、食道癌、胃癌、胆管癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、前立腺癌及び悪性リンパ腫からなる群から選ばれる少なくとも一つである請求項73記載の高カルシウム血症抑制剤。

【請求項75】 請求項27～46のいずれか1項に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項76】 請求項27～46のいずれか1項に記載の抗体を有効成分として含む高カルシウム血症抑制剤。

【請求項77】 請求項27～46のいずれか1項に記載の抗体を有効成分として含む含む、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症抑制剤。

【請求項78】 悪性腫瘍が、膵臓癌、肺癌、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、歯肉癌、食道癌、胃癌、胆管癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、前立腺癌及び悪性リンパ腫からなる群から選ばれる少なくとも一つである請求項77記載の高カルシウム血症抑制剤。

【請求項79】 ヒト副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するヒト型化抗体を有効成分として含む低リン血症改善剤。

【請求項80】 低リン血症が低リン血性くる病である請求項79記載の低リン血症改善剤。

【請求項81】 低リン血症が低リン血性ビタミンD抵抗性くる病である請求項79記載の低リン血症改善剤。

【請求項82】 請求項27～46のいずれか1項に記載の抗体を有効成分として含む低リン血症改善剤。

【請求項83】 低リン血状が低リン血性くる病である請求項82記載の低リン血症改善剤。

【請求項84】 低リン血状が低リン血性ビタミンD抵

抗性くる病である請求項82記載の低リン血症改善剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域（V領域）とヒト抗体の定常領域（C領域）とからなるヒト／マウスキメラ抗体、副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖（L鎖）V領域及び重鎖（H鎖）V領域の相捕性決定領域がヒト抗体に移植されているヒト型化（humanized）抗体、該抗体のL鎖及びH鎖、並びに該抗体のL鎖又はH鎖を構成するV領域を含むポリペプチドに関する。

【0002】本発明はさらに、上記の抗体、特にそのV領域をコードする塩基配列を含むDNA、及びV領域を含むL鎖又はH鎖をコードするDNAに関する。本発明はさらに、該DNAを含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主に関する。

【0003】本発明はさらに、副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対するキメラ抗体及びヒト型化抗体の製造方法に関する。本発明はさらに、副甲状腺ホルモン関連ペプチドに対する抗体を有効成分として含む医薬組成物並びに高カルシウム血症抑制剤及び低リン血症改善剤に関する。

【0004】

【従来の技術】悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症は、全悪性腫瘍患者の5～20%にみられる重篤な合併症状であり、放置すれば確実に死に至るため悪性腫瘍の末期的症状であると考えられている。高カルシウム血症のコントロールは患者の治療予後とQOL（Quality of Life）に大きく影響することから、臨床的に重要な役割を持つ。

【0005】悪性腫瘍患者における高カルシウム血症は、一般に、腫瘍産生性の体液性骨吸収因子によるHHM（Humoral hypercalcemia of malignancy）と、骨に転移又は浸潤した腫瘍の局所的な作用によるLOH（Local osteolytic hypercalcemia）とに大別される。HHMでは骨吸収又は骨破壊の亢進によりカルシウムの流出が増加し、腎のカルシウム排泄能の低下とあいまって高カルシウム血症を生ずると考えられている（和田誠基及び永田直一、内科69、644-648）。

【0006】高カルシウム血症は、血清カルシウム値が12mg/dlを超えるとその症状が現れると考えられ、その症状として、初期に食思不振、悪心、嘔吐が悪性腫瘍患者において非特異的に認められる。高カルシウム血症が悪化すると、腎遠位尿細管の障害で水分の濃縮力が低下するために多尿となり、また、悪心、嘔吐により水分が十分に摂取されないため脱水を伴う。

【0007】悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症のうちHHMを起こす液性因子として、PTH（副甲状腺ホルモン；Parathyroid Hormone）様の物質である副甲状腺ホルモン関連ペプチド（Parathyroid Hormone related Peptid

e、以下「PTHrP」という)がMoseley, J. M.らにより見いだされた(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987)、84、5048-5052)。

【0008】その後、PTHrPをコードする遺伝子が単離され(Suva, L. J. et al., Science(1987) 237, 893)その解析から、ヒトPTHrPは遺伝子の選択的スプライシングに基づく139、141及び173個のアミノ酸からなる三種が存在すること、並びに血中では全構造を有するPTHrP(1-139)の限定分解に基づく様々なフラグメントが存在することが明らかになった(Baba, H. Clinical Calcium (1995) 5, 229-223)。PTHrPは、N末端側第1位から第13位のアミノ酸13個のうち8個がPTHと同一である他、第14位から第34位アミノ酸部位においてもPTHと類似の立体構造を呈するものと推定され、少なくともN末端側においてはPTHと共通のPTH/PTHrP受容体に結合する(Jueppner, H. et al., Science (1991) 254, 1024-1026、Abou-Samra, A-B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 2732-2736)。

【0009】PTHrPは様々な腫瘍組織から産生されることが報告されているが、腫瘍のみならず、皮膚、中枢神経、子宮、胎盤、授乳中の乳腺、甲状腺、副甲状腺、副腎、肝、腎、膀胱をはじめとする、胎児から成人に至るまでの種々の正常な組織により産生されることが明らかになった(Burtis, W. J. Clin. Chem. (1992) 38, 2171-2183、Stewart, A. F. & Broadus, A. E. J. Clin. Endocrinol. (1991) 71, 1410-1414)。また、PTHrPは、胎児期から新生児期にかけて母体より高く保たれるカルシウム代謝調節に重要な役割を演じていると考えられている。

【0010】PTH/PTHrP受容体は主に骨と腎に存在し(滋野長平、Clinical Calcium (1995) 5, 355-359)、PTHrPが受容体に結合することにより複数の細胞内シグナル伝達系が活性化されることが知られている。その一つは、アデニルシクラーゼであり、もう一つはフォスフォリパーゼCである。アデニルシクラーゼの活性化により、細胞内cAMP濃度が上昇しプロテインキナーゼAが活性化される。また、フォスフォリパーゼCはフォスファチジルイノシトール4、5-ビスフォスフォネートを分解してイノシトール1, 4, 5-トリフォスフォネートとジアシルグリセロールを生じさせる。これらのシグナル伝達系にはG蛋白質が関与する(Coleman, D. T. et al., Biochemical mechanisms of parathyroid hormone action. In: "The parathyroids" (Bilezikian, J. P. et al.), Raven press, New York, (1994) page 239)。

【0011】PTHrPは、これらのシグナル伝達系を介して、HHMに観察される高カルシウム血症、低リン血症、腎リン再吸収能の低下、腎性cAMP排泄の増加などを引き起こす。このように、PTHrPは悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症に密接に関連していることが明らかになっている。悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療には補液を

行う他、カルシトニン、ステロイド剤、インドメタシン、無機リン酸塩、ビスフォスフォネート等が使用される。しかしながら、これらの薬剤は連続使用により効果が低減すること、強い副作用が発現すること、又は薬効発現が遅いことなどから、より治療効果が高く副作用の少ない薬剤の使用が期待されている。

【0012】一方、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症治療の新しい試みとして、Kukreja, S. C.らは、ヒト肺ガン細胞又はヒト喉頭ガン細胞を移植して高カルシウム血症を生じた無胸腺マウスにPTHrPに対する中和抗血清を投与すると、血中カルシウム濃度及び尿cAMPレベルが減少したことを報告している(J. Clin. Invest. (1988) 82, 1798-1802)。佐藤幹二らは、PTHrP産生ヒト腫瘍を移植したヌードマウスにPTHrP(1-34)に対する抗体を投与すると、高カルシウム血症を低減させ、マウスの生存時間を大幅に延長させたことを報告している(J. Bone & Mine. Res. (1993) 8, 849-860)。また、特開平4-228089号には、ヒトPTHrP(1-34)に対するマウス/ヒトキメラ抗体が開示されている。

【0013】マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性(「抗原性」という場合もある)を有し、このため、ヒトにおけるマウスモノクローナル抗体の医学療法的価値は制限されている。例えば、マウス抗体をヒトに投与すると異物として代謝されるので、ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を十分に発揮できない。さらに、投与したマウス抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体(HAMA)は、血清病又は他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応答を惹起する。したがって、マウスモノクローナル抗体をヒトに頻回投与することはできない。

【0014】これらの問題を解決するため、非ヒト由来の抗体、例えばマウス由来のモノクローナル抗体の免疫原性を低減させる方法が開発された。その一つが、抗体の変領域(V領域)はもとのマウスモノクローナル抗体に由来し、定常領域(C領域)は適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法である。

【0015】得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の変領域を完全な形で含有するので、もとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することが期待できる。さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来するアミノ酸配列の比率が実質的に減少しており、それ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体はもとのマウスモノクローナル抗体と同等に抗原に結合し、かつ免疫原性が低い、それでもなおマウス可変領域に対する免疫応答が生ずる可能性がある(LoBullio, A. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989)。

【0016】マウス抗体の免疫原性を低減させるための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させることが期待さ

れる。この方法においては、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) のみをヒト可変領域に移植して「再構成」(reshaped) ヒト可変領域を作製する。ただし、必要によっては、再構成ヒト可変領域の CDR の構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDR を支持しているフレームワーク領域 (FR) の一部のアミノ酸配列をマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植する場合がある。

【0017】次に、これらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型化抗体のヒト以外のアミノ酸配列に由来する部分は、CDR 及び極く一部の FR のみである。CDR は超可変アミノ酸配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さない。このため、マウス CDR を担持するヒト型化抗体は、もはやヒト CDR を含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

【0018】ヒト型化抗体については、さらに、Riechmann, L. et al., *Nature*, 332, 323-327, 1988; Verhoeve, M. et al., *Science*, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. et al., *Protein Engng.*, 4, 773-783, 1991; Maeda, H. et al., *Human Antibodies and Hybridoma*, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P. R. et al., *Bio/Technology*, 9, 266-271, 1991; Co, M. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2869-2873, 1991; Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. et al., *J. Immunol.*, 148, 1149-1154, 1992; 及び Sato, K. et al., *Cancer Res.*, 53, 851-856, 1993 を参照のこと。

【0019】前記のごとく、ヒト型化抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、PTHrP に対するヒト型化抗体は知られておらず、前記文献にはその示唆もなされていない。また、ヒト型化抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的な方法は存在せず、特定の抗原に対して十分な結合活性、中和活性を示すヒト型化抗体を作製するためには種々の工夫が必要である (例えば、Sato, K. et al., *Cancer Res.*, 53, 851-856, 1993 を参照のこと)。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域 (V 領域) とヒト抗体の定常領域 (C 領域) とからなるヒト/マウスキメラ抗体、PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖 (L 鎖) V 領域及び重鎖 (H 鎖) V 領域の相補性決定領域がヒト抗体に移植されているヒト型化 (humanized) 抗体、該抗体の L 鎖及び H 鎖、並びに該抗体の L 鎖又は H 鎖を構成する V 領域を含むポリペプチドを提供することを目的とする。

【0021】本発明はさらに、上記の抗体、特にその V

領域をコードする塩基配列を含む DNA、及び V 領域を含むポリペプチドを含む L 鎖又は H 鎖をコードする DNA を提供することを目的とする。本発明はさらに、該 DNA を含む組換えベクター、及び該ベクターにより形質転換された宿主を提供することを目的とする。本発明はさらに、PTHrP に対するキメラ抗体及びヒト型化抗体の製造方法を提供することを目的とする。本発明はさらに、中和活性が高い PTHrP に対する抗体を提供することを目的とする。本発明はさらに、PTHrP に対する抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物並びに高カルシウム血症抑制剤、低リン血症改善剤及びアルカローシス改善剤を提供することを目的とする。

【0022】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体のヒトにおける免疫原性が低減されている抗体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、ヒト抗体の L 鎖 C 領域、及び PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域を含むキメラ L 鎖である。L 鎖 V 領域としては、配列番号 45 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、L 鎖 C 領域としては C λ 領域のものが挙げられる。

【0023】さらに、本発明は、ヒト抗体の H 鎖 C 領域、及び PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を含むキメラ H 鎖である。H 鎖 V 領域としては、配列番号 46 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、C 領域としては C γ 1 領域のものが挙げられる。さらに、本発明は、前記キメラ L 鎖及びキメラ H 鎖を含む、PTHrP に対するキメラモノクローナル抗体である。

【0024】さらに、本発明は、ヒト抗体の L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 1~4、及び PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の相補性決定領域 1~3 を含む、ヒト型化抗体の L 鎖 V 領域を含むポリペプチドである。相補性決定領域 1~3 としては、それぞれ配列番号 59~61 で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられる。フレームワーク領域 1~3 としてはそれぞれヒト抗体 HSU03868 のフレームワーク領域 1~3 由来のもの、かつ、フレームワーク領域 4 としてはヒト抗体 S25755 のフレームワーク 4 由来のものが挙げられる。あるいは、フレームワーク領域 1~3 としてはそれぞれヒト抗体 HSU03868 のフレームワーク領域 1~3 と実質的に同一のもの、かつ、フレームワーク領域 4 としてはヒト抗体 S25755 のフレームワーク領域 4 と実質的に同一のものが挙げられる。

【0025】ここで、「実質的に同一」とは、ヒト型化抗体において使用されるヒト抗体のフレームワーク領域において、ヒト型化抗体がマウスモノクローナル抗体と同等の活性を有するように、マウスモノクローナル抗体の相補性決定領域を形成するために必要なアミノ酸の欠

失、置換、付加等を生じてよいことを意味する。

【0026】さらに、本発明は、フレームワーク領域中のKabatの規定(Kabat, E.A. et al., US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)による第36番目のアミノ酸がチロシンであり、かつ、同第49番目のアミノ酸がアスパラギン酸である、ヒト型化抗体のL鎖V領域を含むポリペプチドである。

【0027】さらに、本発明は、配列番号48~51で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体のL鎖V領域を含むポリペプチドである。さらに、本発明は、フレームワーク領域中のKabatの規定による第45番目のアミノ酸がリジンであり、かつ、同第87番目のアミノ酸がイソロイシンである、ヒト型化抗体のL鎖V領域を含むポリペプチドである。さらに、本発明は、配列番号52~55で表されるいずれかのアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体のL鎖V領域を含むポリペプチドである。

【0028】さらに、本発明は、ヒト抗体のH鎖V領域のフレームワーク領域1~4、及びヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の相補性決定領域1~3を含む、ヒト型化抗体のH鎖V領域を含むポリペプチドである。相補性決定領域1~3としては、それぞれ配列番号62~64で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、フレームワーク領域1~4としては、ヒトサブグループIII (Human Subgroup III (HSG III)、Kabat, E.A. et al., US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)に属するヒト抗体のフレームワーク領域1~4由来のもの、より詳しくはそれぞれヒト抗体S31679のフレームワーク領域1~4由来のものが挙げられ、あるいはヒト抗体S31679のフレームワーク領域1~4と実質的に同一のものが挙げられる。

【0029】さらに、本発明は、配列番号56で表されるアミノ酸配列を含む、ヒト型化抗体のH鎖V領域を含むポリペプチドである。さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖V領域を含むポリペプチド及びヒト抗体のL鎖C領域を含むポリペプチドを含む、ヒトPTHrPに対するヒト型化抗体のL鎖である。ここで、C領域としてはC λ 領域、フレームワーク領域1~3としてはそれぞれヒト抗体HSU03868のフレームワーク領域1~3と実質的に同一のもの、フレームワーク領域4としてはヒト抗体S25755のフレームワーク領域4と実質的に同一のもの、そして相補性決定領域1~3のアミノ酸配列としてはそれぞれ配列番号59~61で表されるものが挙げられる。

【0030】さらに、本発明は、前記ヒト抗体のH鎖C領域を含むポリペプチド及びH鎖V領域を含むポリペプチドを含む、ヒトPTHrPに対するヒト型化抗体のH鎖である。C領域としてはC γ 1領域、フレームワーク領域1~4としてはHSGIIIに属するヒト抗体由来のフレームワーク領域1~4由来のもの、そして相補性決定領域1~3としてはそれぞれ配列番号62~64で表されるアミノ

酸配列を含むものが挙げられる。

【0031】さらに、本発明は、抗原性が弱く、中和活性が高い抗PTHrP抗体に関する。該PTHrP抗体はヒトの疾患の治療に供することが可能な、ヒト抗体、ヒト型化抗体、キメラ抗体、プライマタイズド抗体などを含む。また、該抗体は低い解離定数を有するものである。さらに、本発明の抗体は解離定数が小さいため中和活性が高く、ヒトの疾患の治療に供することができる。

【0032】本発明の抗体は、 1.86×10^{-7} [M] 以下の解離定数、 1.22×10^{-1} [1/Sec]以下の解離速度定数、そして 6.55×10^4 [1/M.Sec]以上の結合速度定数を有するものである。また、これらの定数は、RI標識されたりガンドを用いたスキッチャード解析や表面プラズモン共鳴センサー等により測定することができる。

【0033】さらに、本発明は、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNA又はH鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAである。L鎖V領域及びH鎖V領域としては、それぞれ配列番号45、46で表されるアミノ酸配列を含むものが挙げられ、L鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAとしては例えば配列番号65で表されるものが挙げられ、H鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAとしては配列番号57で表されるものが挙げられる。

【0034】さらに、本発明は、前記キメラL鎖又はキメラH鎖をコードするDNAである。該L鎖をコードするDNAとしては例えば配列番号65で表される塩基配列を含むものが挙げられ、該H鎖をコードするDNAとしては配列番号57で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0035】さらに、本発明は、前記ヒト型化抗体のL鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNA又はH鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAである。L鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAとしては配列番号66~74で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられ、H鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAとしては配列番号58で表されるものが挙げられる。

【0036】さらに、本発明は、配列番号47~55で表されるいずれかのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む、ヒト型化抗体のL鎖V領域のDNAである。該DNAとしては、配列番号66~74で表されるいずれかの塩基配列を含むものが挙げられる。さらに、本発明は、配列番号56で表されるアミノ酸配列をコードする、ヒト型化抗体のH鎖V領域のDNAである。該DNAとしては配列番号58で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0037】さらに、本発明は、前記いずれかのDNAを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターにより形質転換された形質転換体である。さらに、本発明は、前記形質転換体を培養し、得られる培養物からヒト副甲状腺関連ペプチドに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を採取することと特徴とするヒ

ト副甲状腺関連ペプチドに対するキメラ抗体又はヒト型化抗体の製造方法である。

【0038】さらに、本発明は、前記抗体を有効成分として含む医薬組成物並びに高カルシウム血症抑制剤及び低リン血症改善剤である。該カルシウム血症は悪性腫瘍に起因するものであり、また、悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症患者においてはしばしば低リン血症が認められる。従って、本発明の抗体は、上記悪性腫瘍に対する治療又は高カルシウム血症若しくは低リン血症の軽減をするために使用することができる。なお、悪性腫瘍としては、例えば膵臓癌、肺癌、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、歯肉癌、食道癌、胃癌、胆管癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、前立腺癌及び悪性リンパ腫からなる群から選ばれる少なくとも一つが挙げられるが、これらの癌に限定されるものではなく、高カルシウム血症をもたらし悪性腫瘍はすべて本発明の高カルシウム血症抑制剤の適用の対象とすることができる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0039】

【発明の実施の形態】

1. ヒトPTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の作製

PTHrPに対するマウスモノクローナル抗体は、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマからPTHrP活性を特異的に阻害する抗体を産生するクローンを選択することにより調製することができる。

【0040】(1) 抗原の調製

動物の免疫に用いるPTHrPとしては、組換えDNA法又は化学合成により調製したPTHrPのアミノ酸配列の全部若しくは一部のペプチド、又は高カルシウム血症を惹起する癌細胞の培養上清液由来のPTHrPなどが挙げられる。例えば、公知のPTHrP (Kemp, B.E. et al., Science (1987)238, 1568-1570) の第1～34番目のアミノ酸からなるペプチド (PTHrP(1-34)) を抗原として用いることができる。なお、ヒトPTHrP(1-34)は、配列番号75で表されるアミノ酸配列を有するものである。

【0041】得られたPTHrPをキャリアタンパク質 (例えばサイログロブリン) に結合させた後、アジュバントを添加する。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものでも混合してもよい。

【0042】(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取
上記のようにして得られた抗原を哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射などにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ま

しくは4～21日間間隔で免疫する。

【0043】最終の免疫日から2～3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般に脾臓細胞が用いられる。抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、100 µg用いられる。

【0044】(3) 抗体価の測定

免疫した動物の免疫応答レベルを確認し、また、細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選択するため、免疫した動物の血中抗体価、又は抗体産生細胞の培養上清中の抗体価を測定する。抗体検出の方法としては、公知技術、例えばEIA(エンザイムイムノアッセイ)、RIA(ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素連結イムノソルベントアッセイ)等が挙げられる。

【0045】(4) 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ(骨髓腫)細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地(例えばHAT培地)で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼを欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)培地に生育できないものである。

【0046】ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979)123:1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81:1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976)6:511-519)、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8:405-415)、SP2/O (Shulman, M. et al., Nature (1978)276:269-270)、F0 (de St. Groth, S.F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35:1-21)、S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978)148:313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277:131-133)等が好適に使用される。

【0047】抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節細胞などから得られる。すなわち、前記各種動物から脾臓、リンパ節等を摘出又は採取し、これら組織を破碎する。得られる破碎物をPBS、DMEM、RPMI1640等の培地又は緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うことにより目的とする抗体産生細胞を調製する。

【0048】次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、MEM、DMEM、RPME-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1～1:10で融合促進剤の存在下、30～37℃で1～15分間接触させることに

よって行われる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,000~6,000のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0049】(5) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選択する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地（HAT培地など）を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。ハイブリドーマのスクリーニングは、限界希釈法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。

【0050】(6) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10~20%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地、又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で2~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【0051】腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~4週間後に腹水又は血清を採取する。上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製する。

【0052】2. キメラ抗体の構築

(1) ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードする塩基配列を含むDNAのクローニング

(i) mRNAの調製

ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードする塩基配列を含むDNAのクローニングを行うため、回収されたハイブリドーマから公知の方法、例えばグアニジン超遠心法（Chirgwin, J.M. ら、Biochemistry (1979), 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P ら、Analytical Biochemistry (1987), 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia 社製）に添付されたOligo(dT)-セルローススパンカラム等によりmRNAを調製する。また、Quick Prep mRNA Purification Kit

（Pharmacia 社製）を用いることにより、全RNAの抽出操作を経ずに、mRNAの調製を行うこともできる。

【0053】(ii) cDNAの調製及び増幅

上記(i)で得たmRNAから、逆転写酵素を用いてL鎖及びH鎖のV領域におけるcDNAをそれぞれ合成する。cDNAの合成は、Oligo-dTプライマー又はL鎖C領域若しくはH鎖C領域とハイブリダイズする適当なプライマー（例えば配列番号1で表される塩基配列を有するMHC2プライマー）を用いることができる。cDNA合成反応は、前記mRNAとプライマーとを混合し、逆転写酵素の存在下で例えば52℃で30分の反応を行う。

【0054】cDNAの増幅は、L鎖及びH鎖ともに5'-Amplifinder RACE kit（CLONTECH社）を用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989）に基づくPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）にて行うことができる。すなわち、上記で合成したcDNAの5'末端にAmplifinder Anchor（配列番号42）を連結し、L鎖V領域及びH鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNA（以下、L鎖V領域をコードする塩基配列を含むDNAを「L鎖V領域のDNA」又は「L鎖V領域をコードするDNA」と略記することもある（H鎖V領域、C領域等についても同様））についてPCRを行う。

【0055】L鎖V領域のDNAを増幅するためのプライマーとして、例えばAnchorプライマー（配列番号2）及びマウス抗体のL鎖λ鎖定常領域（Cλ領域）の保存配列から設計したプライマー（例えば配列番号4で表される塩基配列を有するMLCプライマー）を用いることができる。また、H鎖V領域のDNAを増幅するためのプライマーとして、例えばAnchorプライマー（配列番号2）及びMHC-G1プライマー（配列番号3）（S.T.Jones ら、Biotechnology, 9, 88, 1991）を用いることができる。

【0056】(iii) DNAの精製及び塩基配列の決定 PCR産物について、公知手法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、目的とするDNA断片を切り出した後、DNAの回収及び精製を行い、ベクターDNAに連結する。DNAの精製は、市販のキット（例えばGENECL EAN II; BIO101）を用いて行われる。DNA断片を保持するためのベクターDNAには公知のもの（例えばpUC19、Bluescript等）を用いることができる。

【0057】前記DNAと上記ベクターDNAとを、公知のライゲーションキット（宝酒造製）を用いて連結させ、組換えベクターを得る。次に、得られる組換えベクターを大腸菌JM109等に導入した後アンピシリン耐性コロニーを選抜し、公知方法に基づいてベクターDNAを調製する（J.Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）。目的と

するDNAの塩基配列は、上記ベクターDNAを制限酵素で消化した後、公知方法（例えばジデオキシ法）により決定する（J.Sambrook, et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）。本発明では、自動塩基配列決定装置（DNA Sequencer 373A; ABI 社）を用いることができる。

【0058】(iv)相補性決定領域

H鎖V領域及びL鎖V領域は、抗原結合部位を形成し、その全般の構造は互いに類似性を有している。すなわち、それぞれ4つのフレームワーク領域（FR）部分、3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域（CDR）により連結されている。FRのアミノ酸配列は比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い（Kabat, E.A.ら、「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）。

【0059】前記4個のFRの多くの部分は、 β -シート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成する。CDRは、ある場合には β -シート構造の一部を形成することもある。従って、3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そしてFRは対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位を形成する。

【0060】このような事実に基づき、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベース（「Sequence of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983）にあてはめて、相同性を調べることにによりCDR領域を見出すことが出来る。

【0061】(2)キメラ抗体の発現ベクターの作製
マウスモノクローナル抗体のマウスL鎖（以下、抗体のL鎖又はH鎖を表す場合は、マウスについては「マウスL鎖」、ヒト抗体のH鎖については「ヒトH鎖」のように略記することもある。）及びH鎖V領域をコードするDNA断片がクローニングされれば、これらのマウスV領域をコードするDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結して発現させることによってキメラ抗ヒトPTHrP抗体が得られる。

【0062】キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及びV領域配列を、哺乳類細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体C領域をコードする配列に連結することを含んでなる。あるいは、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及びV領域の配列をヒト抗体C領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結することを含んでなる。

【0063】ヒト抗体C領域を含むポリペプチドは、任意のヒト抗体のH鎖C領域及びヒト抗体のL鎖C領域のものとしてことができ、例えばヒトH鎖のものについて

はCy1、Cy2、Cy3又はCy4、及びL鎖のものについてはC λ 又はC κ を各々挙げることができる。

【0064】キメラ抗体の製造のためには、まず、2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域をコードするDNA及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域をコードするDNA及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインビトロ又はインビボで培養してキメラ抗体を製造する（例えば、WO91/16928参照）。

【0065】あるいは、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列並びにマウスL鎖V領域をコードするDNA及びヒトL鎖C領域をコードするDNAと、マウスリーダー配列並びにマウスH鎖V領域をコードするDNA及びヒトH鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター（例えば、WO94/11523参照）に導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインビボ又はインビトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

【0066】(i)キメラ抗体H鎖の構築

キメラ抗体のH鎖発現ベクターは、マウスのH鎖V領域をコードする塩基配列を含むcDNA（以下、「H鎖V領域のcDNA」ともいう）を、ヒト抗体のH鎖C領域をコードする塩基配列を含むゲノムDNA（以下、「H鎖C領域のゲノムDNA」ともいう）又は当該領域をコードするcDNA（以下、「H鎖C領域のcDNA」ともいう）を含む適当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。H鎖C領域としては、例えばCy1、Cy2、Cy3又はCy4領域が挙げられる。

【0067】(i-a) H鎖C領域をコードするゲノムDNAを含むキメラH鎖発現ベクターの構築
H鎖C領域をコードするゲノムDNAを有する発現ベクターとしては、Cy1領域をコードするものについては、例えばHEF-PMh-gy1（WO92/19759参照）又はDHF Δ E-RVh-PM1-f（WO92/19759参照）が挙げられる。

【0068】ここで、マウスH鎖V領域をコードするcDNAをこれらの発現ベクターに挿入するにあたり、PCR法により該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするため該cDNAの開始コドン直前にKozakコンセンサス配列を有するように設計したPCRプライマー、及び、該cDNAの3'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そしてゲノムDNAの一次

転写産物が正しくスプライスされmRNAとなるためのスプライドナー部位を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を発現ベクターに導入することができる。

【0069】こうして構築したマウスH鎖V領域をコードするcDNAを適当な制限酵素で処理した後、上記発現ベクターに挿入して、H鎖C領域(C γ 1領域)をコードするゲノムDNAを含むキメラH鎖発現ベクターを構築する。

【0070】(i-b) H鎖をコードする塩基配列を含むcDNAを含むキメラH鎖発現ベクターの構築
H鎖C領域(例えばC γ 1領域)をコードするcDNAを有する発現ベクターは、以下のようにして構築することができる。すなわち、ヒト型化PM1抗体のH鎖V領域及びヒト抗体H鎖C領域C γ 1のゲノムDNA(N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982)をコードするDNAを含む発現ベクターDHFR- Δ E-RVh-PM1-f(WO92/19759参照)と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域のゲノムDNA及びヒト抗体L鎖 κ 鎖C領域のゲノムDNAをコードするDNAを含む発現ベクターRV1-PM1a(WO92/19759参照)とを導入したCHO細胞からmRNAを調製し、RT-PCR法により、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域コードするcDNA及びヒト抗体H鎖C領域(C γ 1)をコードするcDNAをクローニングし、該cDNAを適当な制限酵素処理を行った動物細胞発現用ベクターに連結することにより、目的とする発現ベクターが構築される。

【0071】ここで、マウスH鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト抗体H鎖C領域C γ 1をコードするcDNAと直接連結するにあたり、H鎖V領域をコードするcDNAを含む断片に、PCR法により適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするために該cDNAの開始コドン直前にKozakコンセンサス配列を有するように設計したPCRプライマー、及び、該cDNAの3'-末端にH鎖C領域C γ 1のDNAと直接連結するための適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を該cDNAに導入する。

【0072】こうして構築したマウスH鎖V領域をコードするcDNAを適当な制限酵素で処理して、上記H鎖C領域C γ 1をコードするcDNAと連結して、pCOS1又はpCHO1のごとき発現ベクターに挿入することにより、キメラH鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築することが出来る。

【0073】(ii)キメラ抗体L鎖の構築

キメラ抗体のL鎖発現ベクターは、マウスL鎖V領域をコードするcDNAと、ヒト抗体のL鎖C領域をコード

するゲノムDNA又はcDNAとを連結し、適当な発現ベクターに導入することにより得ることが出来る。L鎖C領域としては、例えば κ 鎖又は λ 鎖が挙げられる。

【0074】(ii-a) キメラL鎖 λ 鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターの構築

マウスL鎖V領域をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築するにあたり、PCR法により適当な塩基配列を該発現ベクターに導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするためのKozakコンセンサス配列を有するように設計したPCRプライマー、及び、3'-末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を該cDNAに導入する。

【0075】ヒトL鎖 λ 鎖C領域をコードするcDNAは、全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。ヒトL鎖 λ 鎖C領域は、アイソタイプの違いにより少なくとも4種類の存在が知られ、いずれのアイソタイプも発現ベクターの構築に用いることが可能である。例えば、クローニングしたマウスモノクローナル抗体L鎖 λ 鎖C領域との相同性の検索から、ヒトL鎖 λ 鎖C領域断片のアイソタイプとしてMcg+Ke+Oz-(accession No. X57819)(P. D. Ariavachら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)のものを選択して発現ベクターの構築に用いることが出来る。公知のヒトL鎖 λ 鎖C領域、例えばMcg+Ke+Oz-のcDNAを構築するために、例えば配列番号11から14に示す4本の下記プライマーに分ける。プライマーMBC1HGPI(配列番号11)及びMBC1HGPI3(配列番号13)はセンスDNA配列を有し、MBC1HGPI2(配列番号12)及びMBC1HGPI4(配列番号14)はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23bpの相補的配列を有する様に設計する。

【0076】MBC1HGPI5(配列番号15)及びMBC1HGPI6(配列番号16)は外部プライマーと呼ばれ、MBC1HGPI1、MBC1HGPI4とそれぞれ相同な配列を有しており、それぞれ適当な制限酵素の認識配列をそれぞれ含んでいる。PCR法を用いて、4本のプライマーをアセンブリさせ、完全長のcDNA合成し、さらに外部プライマーを加えcDNAの増幅を行う。PCR法によるアセンブリとは、MBC1HGPI1とMBC1HGPI2、又はMBC1HGPI3とMBC1HGPI4とがその相補的配列によりアニーリングし、MBC1HGPI1-MBC1HGPI2断片とMBC1HGPI3-MBC1HGPI4断片が合成され、さらに、各断片の相補的配列によりアニーリングして、完全長のヒトL鎖 λ 鎖C領域をコードするcDNAが合成されることを指す。

【0077】このようにして構築したヒトL鎖λ鎖C領域をコードするcDNAと、上記のようにして構築したマウスL鎖V領域をコードするcDNAとを、適当な制限酵素部位間で連結し、さらにpCOS1又はpCHO1のごとき発現ベクターに挿入することにより、キメラ抗体のL鎖λ鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築することが出来る。

【0078】(ii-b)キメラL鎖κ鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターの構築

マウスL鎖V領域をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築するにあたり、PCR法により、該cDNAに適当な塩基配列を導入することが出来る。例えば、該cDNAの5'一末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように、そして転写効率をよくするためのKozakコンセンサス配列を有するように設計したPCRプライマー、及び、3'一末端に適当な制限酵素の認識配列を有するように設計したPCRプライマーを用いてPCRを行うことで、これら適当な塩基配列を該cDNAに導入する。

【0079】マウスL鎖V領域をコードするDNAと連結させるためのヒトL鎖κ鎖C領域をコードするDNAは、例えばゲノムDNAを含むHEF-PM1k-gk(WO92/19759参照)から構築することが出来る。PCR法により、L鎖κ鎖C領域をコードするDNAの5'一末端及び3'一末端に適当な制限酵素の認識配列を導入し、上記のようにして構築したマウスL鎖V領域をコードするDNAとL鎖κ鎖C領域をコードするDNAとを連結し、pCOS1又はpCHO1のごとき発現ベクターに挿入することにより、キメラ抗体のL鎖κ鎖をコードするcDNAを含む発現ベクターを構築することが出来る。

【0080】3. ヒト型化抗体の作製

(1) ヒト抗体との相溶性検査

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されているヒト型化抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒト抗体のFRとの間に高い相溶性が存在することが望ましい。従って、マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖のV領域を、プロテイン・データ・バンクを用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較する。また、同時にKabataらにより、抗体のFRの長さ、アミノ酸の相溶性等によって分類されたヒト抗体のサブグループ(HSG: Human subgroup)(Kabat, E.A. ら, US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)との比較を行う。

【0081】ヒトH鎖V領域の場合は、KabataらによるHSG分類により、HSGI~IIIに分類することが出来、マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体H鎖V領域は、HSGIIIのコンセンサス配列と82.7%のホモロジーを有する。一方、ヒトL鎖λ鎖V領域は、K

abataらによるHSG分類により、HSGI~VIに分類することが出来、マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体L鎖λ鎖V領域は、いずれのサブグループに属するヒトL鎖λ鎖V領域のコンセンサス配列とも高いホモロジーを有さない。

【0082】従って、マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体をヒト型化する際には、ヒトH鎖V領域としてHSGIIIに属し、最も相溶性の高いヒトH鎖V領域、又はカノニカルストラクチャー(Chothia C, et al., J. Mol. Biol. 196, 901-917, 1987)の一致するFRの構造を有するヒトH鎖V領域をヒト型化抗体の構築に使用することが望ましい。また、ヒトL鎖λ鎖V領域のサブグループには相溶性の高いコンセンサス配列がないことより、プロテイン・データ・バンクに登録されている最も高い相溶性を有するヒト抗体L鎖λ鎖V領域をヒト型化抗体の構築に使用することが望ましい。

【0083】(2) ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計

ヒト型化抗体V領域をコードするDNAの設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域を選択することである。本発明においては、マウス抗体V領域のFRと80%以上ホモロジーを有するヒト抗体V領域のFRを、ヒト型化抗体に用いることができる。ここで、H鎖V領域のFRとしては、サブグループIIIに属するもの、例えばS31679(NBRF-PDB, Cuisinier A.M. ら, Eur. J. Immunol. 23, 110-118, 1993)由来のFRを実質的に同一なFRの断片として挙げる事ができる。また、L鎖V領域のFRとしては、例えばヒト抗体HSU03868(GEN-BANK, Deftos M ら, Scand. J. Immunol. 39, 95-103, 1994)由来のFR1、FR2及びFR3と、ヒト抗体S25755(NBRF-PDB)由来のFR4とを実質的に同一なFRの断片として挙げる事ができる。なお、ヒト抗体S31679は、ヒト胎児肝臓のcDNAライブラリーよりクローニングされた抗体であり、ヒト抗体HSU03868は新規ヒトL鎖λ鎖V領域の遺伝子としてクローニングされた抗体である。

【0084】(3) ヒト型化抗体V領域を含むポリペプチドの作製

本発明のヒト型化抗体は、該抗体のC領域、及びV領域のフレームワーク(FR)領域がヒト由来のものであり、V領域の相補性決定領域(CDR)がマウス由来のものである(図1)。本発明のヒト型化抗体のV領域を含むポリペプチドは、鋳型となるヒト抗体のDNA断片が入手可能ならば、PCR法によるCDR-グラフティングと呼ばれる手法により作製することができる。「CDR-グラフティング」とは、マウス由来のCDRをコードするDNA断片を作製し、これを鋳型となるヒト抗体のCDRと入れ換える手法をいう。

【0085】また、鋳型となるヒト抗体のDNA断片が入手できない場合は、データベースに登録されている塩

基配列をDNA合成機で合成し、PCR法によりヒト型化抗体V領域のDNAを作製することができる。さらに、アミノ酸配列のみデータベースに登録されている場合は、そのアミノ酸配列を基に、Kabat, E. A.らの報告(US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)している抗体のコドン使用頻度に基づいて、全塩基配列を類推することができる。この塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法によりヒト型化抗体V領域のDNAを作製し、これを適当な宿主に導入して発現させることにより、目的のポリペプチド

【0086】(i) CDR-グラフティング

図2に示すように、V領域をコードするDNAがFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4をコードするDNAの順で連結されているものとする。

【0087】まず、それぞれのCDRに対応するマウス由来のDNA断片を合成する。CDR1～3は、先にクローニングしたマウスH鎖V領域及びL鎖V領域の塩基配列を基に合成されたDNAである。グラフティングプライマーBは、センス方向のマウスCDR1とヒト抗体のFR2にハイブリダイズする配列を有し、グラフティングプライマーEは、アンチセンス方向のCDR1とヒト抗体のFR1にハイブリダイズする配列を有するように合成する(グラフティングプライマーCとF、グラフティングプライマーDとGについても同様)(図2(1))。また、FR1の上流の領域及びFR4の下流の領域にハイブリダイズすることができる適当なプライマー

(外部プライマーという；図2(1)のA及びH)も合成する。なお、グラフティングプライマーの分離、抽出は、公知の手法により行うことができる(Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

【0088】次に、グラフティングプライマーEと外部プライマーA、グラフティングプライマーBとF、グラフティングプライマーCとG、グラフティングプライマーDと外部プライマーHとを用いて第一PCRを行う。その結果、それぞれ断片A-E、断片B-F、断片C-G及び断片D-Hが得られる(図2(2))。

【0089】前記の通り、グラフティングプライマーBの上流とグラフティングプライマーEの下流の一部の領域とが重複するように設計されているので(グラフティングプライマーCとF、DとGについても同様)、これらの断片は、適当な温度条件で反応させることにより、それぞれの相補的配列にアニーリングし、PCRを行うことによりAからHまでの長さを有するDNAにアセンブリすることが可能である。そして、V領域をコードする1本のDNA断片が得られたところで外部プライマ

ーAとHを加え、第二PCRを行うことにより、FR1～4はヒト由来のものであるがCDR1～3はマウス由来のものとなったヒト型抗体V領域をコードするDNAを得る。そして、これを適当な宿主に導入して発現させることにより、目的のポリペプチドを得ることができる(図2(3))。

【0090】(ii)ヒト型化H鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクターの構築

本発明では、ヒト型化抗体の鑄型となるヒト抗体のH鎖V領域をコードするDNAを天然から入手することができないため、当該DNAはH鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。

【0091】マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体H鎖V領域は、ヒトサブグループIIIに属するS31679と高い相同性を有する。このヒト抗体を鑄型としてヒト型化H鎖V領域をコードするDNAを構築するために、例えば配列番号23から26に示す4本のプライマーに分けて使用する。プライマーMBC1HGP1

(配列番号23)及びMBC1HGP3(配列番号24)はセンスDNA配列を有し、MBC1HGP2(配列番号25)及びMBC1HGP4(配列番号26)はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する様に設計する。

【0092】外部プライマーMBC1HVS1(配列番号27)、MBC1HVR1(配列番号28)はMBC1HGP1、MBC1HGP4とそれぞれ相同な配列を有しており、それぞれ適当な制限酵素の認識配列をそれぞれ含んでいる。PCR法を用いて、4本のプライマーをアセンブリさせ完全長のcDNA合成し、さらに外部プライマーを加えDNAの増幅を行う。PCR法によるアセンブリとは、MBC1HGP1とMBC1HGP2、又はMBC1HGP3とMBC1HGP4とがその相補的配列によりアニーリングし、MBC1HGP1-MBC1HGP3断片とMBC1HGP2-MBC1HGP4断片が合成され、さらに、各断片の相補的配列によりアニーリングして、完全長のヒト型化H鎖V領域のDNAが合成されることを指す。

【0093】ヒト抗体H鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えばヒトH鎖Cy1、Cy2、Cy3又はCy4を挙げることができる。前記のようにして構築したヒト型化抗体H鎖V領域のDNAは、任意のヒト抗体H鎖C領域、例えばヒトH鎖C領域Cy1領域のDNAと連結することができる。キメラ抗体H鎖の構築で述べたように、適当な制限酵素にて処理した後、エンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトH鎖C領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域のDNAを含む発現ベクターを作製する。

【0094】(iii) ヒト型化L鎖V領域をコードするDNA及び発現ベクターの構築

本発明では、H鎖V領域をコードするDNAの場合と同様、鋳型となるヒト抗体のL鎖V領域のDNAを天然から入手することができないため、L鎖V領域をコードするDNAの全塩基配列をDNA合成機で合成し、PCR法により構築することが出来る。

【0095】マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体L鎖V領域と最も相同性を有するヒト抗体HSU03868を鋳型としてヒト型化L鎖V領域のDNAを構築するために、例えば配列番号29から32に示す4本のプライマーに分けて使用する。プライマーMBC1LGP1（配列番号29）及びMBC1LGP3（配列番号30）はセンスDNA配列を有し、MBC1LGP2（配列番号31）及びMBC1LGP4（配列番号32）はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する様に設計する。

【0096】外部プライマーMBC1LVS1（配列番号33）、MBC1LVR1（配列番号34）はMBC1LGP1、MBC1LGP4とそれぞれ相同な配列を有しており、それぞれ適当な制限酵素の認識配列をそれぞれ含んでいる。PCR法を用いて、4本のプライマーをアセンブリさせ完全長のDNA合成し、さらに外部プライマーを加えDNAの増幅を行う。PCR法によるアセンブリとは、MBC1LGP1とMBC1LGP3、又はMBC1LGP2とMBC1LGP4とがその相補的配列によりアニーリングし、MBC1LGP1-MBC1LGP3断片とMBC1LGP2-MBC1LGP4断片が合成され、さらに、各断片の相補的配列によりアニーリングして、完全長のヒト型化H鎖V領域をコードするDNAが合成されることを指す。

【0097】ヒト抗体L鎖C領域は任意のヒトL鎖C領域であることができ、例えばヒトL鎖C λ やC κ を挙げることができる。前記のようにして構築したヒト型化抗体L鎖V領域のDNAは、任意のヒト抗体L鎖C領域、例えばヒトL鎖C λ 領域のものと連結することができる。適当な制限酵素で処理した後、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒトL鎖 λ 鎖C領域をコードするDNAと連結し、ヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖 λ 鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。

【0098】前記のようにして、ヒト型化抗体のV領域を含むポリペプチドが作製されても、該ポリペプチドが抗体としての活性（抗原に対する結合活性、中和活性等）を有するか否かは必ずしも明らかではない。特にL鎖の場合は、マウス抗ヒトPTHrPモノクローナル抗体L鎖V領域が、非常に希なV λ x遺伝子由来であるため、ヒト型化H鎖との組み合わせによりCOS-7のごとき動物細胞で発現させ、活性の有無を検討する必要がある。

ある。

【0099】ヒト型化抗体V領域のどのFRが、ヒト型化抗体の結合活性及び中和活性に寄与するのかを明らかにする方法として、ハイブリッドV領域を構築し（Ohtomo, T. et al. Molecular Immunology, 32, 407-416, 1995）、確認するのが有効である。本発明のヒト型化抗体L鎖V領域において、どのアミノ酸を変異させれば活性を有するものが得られるかを調べるため、ヒト型化抗体のFR領域の断片をマウス由来のFR領域の断片と組換えたものをコードするDNAを構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行う。

【0100】図3に示すように、FR1及びFR2はヒト抗体由来であるがFR3及びFR4をマウス抗体由来に組み換えたV領域を含むポリペプチドを有する抗体（このような組み換えた断片を有する抗体を「ハイブリッド抗体」という）、FR1のみをヒトのものに組み換えたハイブリッド抗体、FR2のみをヒトのものに組み換えたハイブリッド抗体を作製する。そして、これらのハイブリッド抗体をコードするDNAを発現ベクターに組み込み、ヒト型化抗体を一過性に発現させ、抗体の活性の有無を調べる。

【0101】本発明者は、この方法を用いてL鎖V領域を含むポリペプチドの抗原結合活性及び中和活性について検討した結果、FR2及びFR3に、置換すべきアミノ酸が存在することが判明した。本発明者は、FR2及びFR3領域に活性に寄与するアミノ酸が存在することが判明し、Kabat, E.A. ら（US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991）により決定された抗体のアミノ酸番号の第36、45及び49番目のアミノ酸（FR2領域に存在する）、並びに第87番目のアミノ酸（FR3領域に存在する）が活性に寄与するアミノ酸であることを明らかにした。

【0102】そこで、本発明では、これらのアミノ酸を変異（例えば置換）させたV領域を含むポリペプチドを作製する。まず、前記CDR-グラフティングにより、アミノ酸の変異を導入させるための基本となるアミノ酸配列を有するV領域を含むポリペプチドを調製する。この基本となるポリペプチドは、配列番号47で表されるアミノ酸配列を含むものであり、「バージョンa」とする（表1のa）。

【0103】次に、このバージョンaを基準として、FRのいくつかのアミノ酸を変異させた種々の変異型断片を作製する。変異の導入は、目的の変異を導入しようとするアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドプライマー（変異原プライマー）を設計し、該プライマーを用いたPCRにより行うことができる。このようにして、FR2及びFR3の特定のアミノ酸を変異させたV領域を含むポリペプチド（バージョンb～t）が作製される（表1のb～t）。

【0104】

27

[illegible]

【0106】また、前記のようにして構築したヒト型化 50

【0107】4. キメラ抗体及びヒト型抗体の製造
キメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するためには、前記のようなそれぞれ2種類の発現ベクターを作製する。す

なわち、キメラ抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製し、ヒト型化抗体については、エンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクター、並びにエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含む発現ベクターを作製する。

【0108】次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造する（例えば、WO 91/16928参照）。

【0109】また、H鎖V領域及びH鎖C領域をコードするDNA、並びにL鎖V領域及びL鎖C領域をコードするDNAを単一ベクターに連結し、適当な宿主細胞を形質転換し、抗体を産生させることができる。すなわち、キメラ抗体の発現には、クローニングされたcDNAに存在するマウスリーダー配列並びにマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAと、マウスリーダー配列並びにマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター（例えば、WO 94/11523参照）に導入する。ヒト型化抗体の発現には、ヒト型化H鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAと、ヒト型化L鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAとを単一の発現ベクター（例えば、WO 94/11523参照）に導入する。そして、これらのベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体を生産させる。

【0110】以上のようにして目的とするキメラ抗体又はヒト型化抗体をコードするDNAで形質転換した形質転換体を培養し、産生したキメラ抗体又はヒト型化抗体は、細胞内又は細胞外から分離し均一にまで精製することができる。なお、本発明の目的蛋白質であるキメラ抗体又はヒト型化抗体の分離・精製を、プロテインAアガロースカラムを用いて行うことができる。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、キメラ抗体又はヒト型化抗体を分離・精製することができる。

【0111】ヒトPTHrPに対する本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体を製造するために、任意の発現系を

使用することができる。例えば、真核細胞を用いる場合は動物細胞（例えば樹立された哺乳類細胞系）、真糸状菌細胞又は酵母細胞などが挙げられ、原核細胞を用いる場合は細菌細胞（例えば大腸菌細胞等）などを使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又はヒト型化抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

【0112】これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス前期（human cytomegalovirus immediate early; HCMV）プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HCγ1、HCMV-VL-HCK等であって、pSV2neoに由来するもの（WO 92-19759）が含まれる。

【0113】また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）などのウイルスプロモーターやヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1α（HEF-1α）などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganらの方法（Nature 277,108,1979）、また、HEF-1αプロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法（Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990）に従えば容易に実施することができる。

【0114】複製起原としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることができ、さらに宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼAPH（3'）II又はI（neo）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチン・グアニンホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子等を含むことができる。

【0115】5. キメラ抗体及びヒト型抗体の抗原結合活性及び中和活性の評価

(1) 抗体の濃度測定

得られた精製抗体の濃度の測定は、ELISAにより行うことができる。抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製する。ELISA用96穴プレート（例えばMaxisorp, NUNC）の各穴を、例えば1μg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体100μlで固相化する。200μlの希釈バッファー（例えば50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% 牛血清アルブミン（BSA）、pH7.2）でブロッキングの後、キメラ抗体、ハイブリッド抗体若しくはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞若

しくはCHO細胞の培養上清、又は精製キメラ抗体、ハイブリッド抗体若しくはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加え、次にアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体100 μ lを加え、1mg/mlの基質溶液(Sigma 104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定する。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1 λ Purified(The Binding Site)を用いることができる。

【0116】(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製する。ELISA用96穴プレートの各穴を1 μ g/mlの濃度に調製したヒトPTHrP(1-34) 100 μ lで固相化する。200 μ lの希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体、ハイブリッド抗体若しくはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞若しくはCHO細胞の培養上清、又は精製キメラ抗体、ハイブリッド抗体若しくはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加え、次にアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体100 μ lを加え、1mg/mlの基質溶液(Sigma 104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(BioRad)で測定する。

【0117】(3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性の測定は、例えばラット骨肉腫細胞株ROS17/2.8-5細胞(Sato, K. et al., Acta Endocrinology 116, 113-120, 1987)を用いて行うことができる。すなわち、ROS17/2.8-5細胞を、4mMのヒドロコルチゾンで刺激し、PTH/PTHrPレセプターを誘導する。1mMのイソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX, SIGMA)でcAMPの分解酵素を阻害し、中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体又はヒト型化抗体をPTHrP(1-34)と等量混合し、各抗体とPTHrP(1-34)の混合液を各穴に添加する。PTHrPの刺激により、ラット骨肉腫細胞株ROS17/2.8-5細胞が産生するcAMPの量を測定することにより、マウス抗体、キメラ抗体又はヒト型抗体の中和能を評価することができる。

【0118】(4) PTHrPと抗PTHrP抗体との相互作用における速度論的解析

本発明では、PTHrPと抗PTHrP抗体との相互作用における速度論を、様々な手法を用いて解析することができる。具体的には、スクヤッチャード解析やBIACOREと呼ばれる表面プラズモン共鳴センサー(ファルマシアバイオテク社により開発・実用化された)により解離定数、解離速度定数、結合速度定数を測定することが可能であるが、本発明では、その一例として、BIACOREと呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより解析する場合を説明する。

【0119】BIACOREの基本構造は、光源とプリズム、ディテクターとマイクロ流路から成っている。実際には、カセット式のセンサーチップ上にリガンドを固定化し、そこにアナライトをインジェクションする。両者に親和性があれば、その結合量が光学的に検出される。

【0120】その検出原理は表面プラズモン共鳴と呼ばれる現象である。すなわち、ガラスと金属薄膜との界面に全反射するように入射した光のうち、ある角度の入射光は表面プラズモンの励起に使われ減衰してしまう。その角度が金属薄膜(センサー)に接している溶媒の濃度変化に依存して変動する。BIACOREはこの変動を検出するというものである。

【0121】BIACOREではこの変化を共鳴シグナル(SPR signal)と呼び、0.1度の変化を1000RU(resonance units)としている。1000RUは表面積1mm²の薄金センサー上に約1ngの蛋白質が結合した場合の変化量であり、蛋白質であれば50RU(50pg)程度の変化を十分検出することができる。検出されたシグナルは、BIACOREに付属しているコンピューターがセンサーグラムと呼ばれる結合曲線に変換し、リアルタイムにコンピューターディスプレイ上に描き出される(夏目徹他、(1995)実験医学、13, p563-569.) (Karlsson, R. et al., (1991) J. Immunol. Methods 145, p229-240.)

【0122】上記BIACOREによって本発明の抗PTHrP抗体のカイネティクスパラメーター、すなわち解離定数(KD)、解離速度定数(Kdiss)および結合速度定数(Kass)を測定することができる。本発明の抗PTHrP抗体は、解離定数(KD値)が小さい値であるほど中和活性を有する点で好ましい。本発明の抗PTHrP抗体において、KD値は 1.86×10^{-7} 以下であることが好ましく、 1.86×10^{-8} 以下であることがより好ましく、 3.58×10^{-10} 以下のものが最も好ましい。

【0123】また、KD値は解離速度定数(Kdiss)および結合速度定数(Kass)の2つのパラメーターから決定される($KD = Kdiss / Kass$)。したがって、Kdissの値が小さく、Kassの値が大きければKD値が小さくなることは明らかである。具体的には、本発明の抗PTHrP抗体の場合、Kdissの値が 1.22×10^{-1} [1/Sec]以下であればよい。好ましくは、Kdissの値が 1.22×10^{-2} 以下であり、より好ましくは 3.16×10^{-4} 以下であり、最も好ましくは 2.32×10^{-4} [1/Sec]以下である。

【0124】一方、Kassの値は 6.55×10^4 [1/M.Sec]以上であればよい。好ましくはKassの値は 6.55×10^5 以上であり、より好ましくは 0.883×10^6 以上であり、最も好ましくは 1.03×10^6 [1/M.Sec]以上である。さらに、Kdissの値が 1.22×10^{-1} [1/Sec]以下であり、かつ、Kassの値が 6.55×10^4 [1/M.Sec]以上の抗PTHrP抗体も好ましい。

【0125】さらに具体的には、本発明の抗PTHrP抗体は、KD値がKD値は $1.02 \times 10^{-11} \sim 1.86 \times 10^{-7}$ [M]の

範囲であり、 $1.02 \times 10^{-10} \sim 1.86 \times 10^{-8}$ [M] のものが好ましく、 $1.34 \times 10^{-10} \sim 3.58 \times 10^{-10}$ [M] のものがより好ましく、 $2.25 \times 10^{-10} \sim 3.58 \times 10^{-10}$ [M] のものが最も好ましい。また、 K_{diss} 値は $7.38 \times 10^{-6} \sim 1.22 \times 10^{-1}$ [1/Sec] の範囲であり、 $7.38 \times 10^{-5} \sim 1.22 \times 10^{-2}$ [1/Sec] のものが好ましく、 $1.66 \times 10^{-4} \sim 3.16 \times 10^{-4}$ [1/Sec] のものがより好ましく、 $1.66 \times 10^{-4} \sim 2.32 \times 10^{-4}$ [1/Sec] のものが最も好ましい。

【0126】そして K_{ass} 値は、 $6.55 \times 10^4 \sim 1.24 \times 10^7$ [1/M.Sec] の範囲であり、 $6.55 \times 10^5 \sim 1.24 \times 10^6$ [1/M.Sec] のものが好ましく、 $7.23 \times 10^5 \sim 1.03 \times 10^6$ [1/M.Sec] のものがより好ましく、 $0.883 \times 10^6 \sim 1.03 \times 10^6$ [1/M.Sec] のものが最も好ましい。これらの K_D 値、 K_{diss} 値および K_{ass} 値はスキャッチャード解析、あるいは BIACORE などの表面プラズモン共鳴センサー等により得ることができるが、BIACORE を用いて得ることが好ましい。

【0127】6. 抗 PTHrP 抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び高カルシウム血症抑制剤 PTHrP に対する抗体又はヒト型化抗体の治療効果を確認するには、PTHrP に対する抗体又はヒト型化抗体を、高カルシウム血症を呈した動物に投与し、高カルシウム血症の指標を測定することによりその治療効果を確認することができる。また、高カルシウム血症を呈した動物及び高カルシウム血症患者においては、しばしば低リン血症が認められるが、本発明の抗体は、この低リン血症を改善するために用いることもできる。

【0128】本発明で使用される抗体は、前記解離定数、解離速度定数及び結合速度定数を有する抗 PTHrP 抗体（ヒト抗体、キメラ抗体、プライマタイズド抗体を含む）、あるいは PTHrP に対するヒト型化された抗体である。この抗体は、PTHrP に結合することにより、PTHrP の活性を中和する抗体であり、特に、好ましくはヒト型化された #23-57-137-1 抗体が挙げられる。ヒト型化 #23-57-137-1 抗体の作製方法は、実施例 1～3 に記載されている。

【0129】本発明で使用される抗体は、塩析法、HPLC 等を用いたゲル濾過法、プロテイン A カラム等を用いたアフィニティークロマトグラフィー法等の通常の精製手段を組み合わせて高純度に精製することができる。このように精製された抗体は、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA、ELISA）、あるいは蛍光抗体法（Immunofluorescence Analysis）等の通常の免疫学的手段により、高精度に PTHrP を認識することを確認できる。

【0130】高カルシウム血症を呈する動物には、PTHrP を産生する腫瘍細胞を免疫機能が低下又は欠失した実験動物に移植することにより作製したモデル動物を使用することができる。移植される腫瘍細胞としては、ヒト由来の腫瘍細胞が好ましく、例えば、ヒト膵臓癌 PAN-7 が挙げられる。また、腫瘍細胞を移植される免疫機能が

低下又は欠失した動物としてはヌードマウス、SCID マウスが挙げられる。高カルシウム血症の抑制の評価は、血中カルシウム濃度、体重減少、あるいは運動量の低下を経時観察し、その改善の程度を評価することによって行われる。

【0131】本発明の PTHrP に対する抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び高カルシウム血症抑制剤は、非経口的に全身又は局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり 0.01mg から 1000mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり 5～10000 mg/body、好ましくは 50～1000mg/body の投与量を選ぶことができる。

【0132】本発明の PTHrP に対する抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含む医薬組成物及び高カルシウム血症抑制剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせで選択されるが、これらに限定されるものではない。

【0133】なお、本発明の抗体は、種々の癌（悪性腫瘍）によって誘発される高カルシウム血症に広く使用することができる。これらの癌種は特に限定されるものではなく、単一の癌のみならず複数の癌が併発したものも含まれる。癌種としては、例えば膵臓癌、肺癌、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、歯肉癌、食道癌、胃癌、胆管癌、乳癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、前立腺癌又は悪性リンパ腫などが挙げられる。

【0134】

【実施例】以下、参考例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例等にその技術的範囲を限定するものではない。

【参考例 1】

抗 PTHrP (1-34) マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒト PTHrP (1-34) に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #23-57-154 および #23-57-137-1 の作製は、佐藤幹二らによって行われた (Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993)。

【0135】免疫原として使用するために、PTHrP (1-34) (Peninsula 製) とキャリアタンパクであるサイログロブリンをカルボジミド (Dojinn) を用いて結合した。サイログロブリンと結合した PTHrP (1-34) を透析し、タンパク濃度として $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製した後、フロイントアジュバント (Difco) と 1:1 で混合し、エマルジョン作製後、16匹の雌性 BALB/C マウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり $100 \mu\text{g}$ を 11 回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

【0136】免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、マウス尾静脈より採血し、血清分離後 RIA バッファーで希釈した抗血清と ^{125}I 標識 PTHrP (1-34) を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアタンパクを結合していない PTHrP (1-34) を動物あたり $50 \mu\text{g}$ を最終免疫した。

【0137】最終免疫 3 日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株 P3x63Ag8U.1 を、50% ポリエチレングリコール 4000 を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を 2×10^4 /ウェルの細胞数で 85 枚の 96 穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別は HAT 培地を用いて行った。

【0138】ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT 培地中で生育の認められた穴の培養上清を固相化 RIA 法にて PTHrP 認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15% FCS を含む RPMI-1640 培地に OPI-supplement (Sigma) を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PTHrP (1-34) との結合能の強いクローン #23-57-154 および #23-57-137-1 を得た。

【0139】なお、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1 として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、平成 8 年 8 月 15 日に、FERM BP-5631 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0140】〔実施例 1〕ヒト PTHrP (1-34) に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする DNA のクローニング

ヒト PTHrP (1-34) に対するマウスモノクローナル抗体 #23-57-137-1 の可変領域をコードする DNA を次の様にしてクローニングした。

(1) mRNA の調製

ハイブリドーマ #23-57-137-1 からの mRNA を Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech 社) を用いて調製した。ハイブリドーマ #23-57-137-1 の細胞を抽出バッファーで完全にホモジナイズし、キット添付の処方に従い、オリゴ(dT)-セルローススパンカラム (Oligo(dT)-Cellulose Spun Column) にて mRNA を精製し、エタノール沈殿をおこなった。mRNA 沈殿物を溶出バッファーに溶解した。

【0141】(2) マウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の cDNA の作製および増幅

(i) #23-57-137-1 抗体 H 鎖 V 領域 cDNA のクローニング

ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域をコードする DNA のクローニングは、5'-RACE 法 (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE 法には 5'-Ampli FINDER RACE kit (CLONETECH 社) を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA 合成に使用するプライマーは、マウス H 鎖定常領域 (C 領域) とハイブリダイズする MHC 2 プライマー (配列番号 1) を用いた。前記のようにして調製した mRNA 約 $2 \mu\text{g}$ を鋳型として MHC 2 プライマー 10 pmole を加え、逆転写酵素と 52°C 、30 分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

【0142】6N NaOH で RNA を加水分解 (65°C 、30 分間) した後、エタノール沈殿により cDNA を精製した。T4 RNA リガーゼで 37°C で 6 時間、室温で 16 時間反応することにより、合成した cDNA の 5' 末端に Ampli FINDER Anchor (配列番号 42) を連結した。これを鋳型として PCR により増幅するためのプライマーとして Anchor プライマー (配列番号 2) および MHC-G1 プライマー (配列番号 3) (S.T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991) を使用した。

【0143】PCR 溶液は、その $50 \mu\text{l}$ 中に 10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl_2 、2.5 ユニットの TaKaRa Taq (宝酒造)、10 pmole の Anchor プライマー、並びに MHC-G1 プライマー及び Ampli FINDER Anchor を連結した cDNA の反応混合物 $1 \mu\text{l}$ を含有する。この溶液に $50 \mu\text{l}$ の鉱油を上層した。PCR は Thermal Cycler Model 480J (Perkin Elmer) を用い、 94°C にて 45 秒間、 60°C にて 45 秒間、 72°C にて 2 分間の温度サイクルで 30 回行った。

【0144】(ii) #23-57-137-1 抗体 L 鎖 V 領域の cDNA のクローニング

ヒト PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域をコードする DNA のクローニングは、5'-RACE 法 (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucl

eic Acids Res.17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE 法には 5'-Ampli Finder RACE Kit(Clontech)を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA 合成に使用するプライマーは、oligo-dTプライマーを用いた。前記のように調製したmRNA約2μgを鋳型としてoligo-dTプライマーを加え、逆転写酵素と52℃、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。6N NaOHでRNAを加水分解(65℃、30分間)した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。合成したcDNAの5'末端に前記Ampli FINDER AnchorをT4RNAリガーゼで37℃で6時間、室温で16時間反応させることにより連結した。

【0145】マウスL鎖λ鎖定常領域の保存配列からPCRプライマーMLC(配列番号4)を設計し、394 DNA/RNA シンセサイザー(ABI社)を用いて合成した。PCR溶液は、その100μl中に10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5mM MgCl₂、2.5ユニットのAmpliTaq(Perkin Elmer)、50pmoleのAnchorプライマー(配列番号2)、並びにMLC(配列番号4)およびAmpli FINDER Anchorを連結したcDNAの反応混合物1μlを含有する。この溶液に50μlの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model 480J(Perkin Elmer)を用い、94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで35回行った。

【0146】(3)PCR生成物の精製および断片化前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H鎖V領域として約550bp長、L鎖V領域として約550bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液20μlに溶解した。得られたDNA溶液1μlを制限酵素XmaI(New England Biolabs)により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素EcoRI(宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。こうして、5'末端にEcoRI認識配列を有し、3'末端にXmaI認識配列を有するマウスH鎖V領域をコードするDNAおよびL鎖V領域をコードするDNAを得た。

【0147】上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードするDNAおよびL鎖V領域をコードするDNAを含むEcoRI-XmaI DNA断片と、EcoRI 及びXmaIで消化することにより調製したpUC19ベクターとを、DNAライゲーションキットver.2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。次に10μlの上記連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細

胞(ニッポンジーン)100μlに加え、この細胞を氷上で15分間、42℃にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。次いで300μlのSOC培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)を加えて37℃にて30分間インキュベートした後、100μg/ml又は50μg/mlのアンピシリン、0.1mMのIPTG、20μg/mlのX-galを含むLB寒天培地または2xYT寒天培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0148】この形質転換体を100μg/ml又は50μg/mlのアンピシリンを含有するLB培地または2xYT培地2mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機PI-100Σ(クラボウ)又はQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

【0149】(4)マウス抗体V領域をコードするDNAの塩基配列決定

前記プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、ダイターミネーターサイクルシーケンシングキット(Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer))を用い、DNAシーケンサー373A(ABI社Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)(配列番号5)及びM13 Primer R V(宝酒造)(配列番号6)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

【0150】こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードするDNAを含有するプラスミドをMBC1H04、L鎖V領域をコードするDNAを含有するプラスミドをMBC1L24と命名した。プラスミドMBC1H04およびMBC1L24に含まれるマウス#23-57-137-1抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするDNAの塩基配列(対応するアミノ酸配列を含む)をそれぞれ配列番号57、65に示す。H鎖V領域を含むポリペプチド及びL鎖V領域を含むポリペプチドは、いずれも、それぞれ配列番号57、65で表される塩基配列の第58番目(グルタミンをコードする)から開始されている。これらのアミノ酸配列を、H鎖V領域含むポリペプチドについては配列番号46、L鎖V領域含むポリペプチドについては配列番号45に示す。

【0151】なお、前記プラスミドMBC1H04およびMBC1L24を有する大腸菌は、Escherichia coli JM109(MBC1H04)およびEscherichia coli JM109(MBC1L24)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109(MBC1H04)についてはFERM BP-5628、Escherichia coli JM109(MBC1L24)についてはFERM BP-5627としてブダペスト条約に基づき国際寄託されて

いる。

【0152】(5) ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1のCDRの決定
H鎖V領域およびL鎖V領域の全般の構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良好に保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, E.A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。*

V領域	配列番号	CDR1	CDR2	CDR3
H鎖V領域	57	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	65	23-34	50-60	93-105

【0155】〔実施例2〕キメラ抗体の構築

(1) キメラ抗体H鎖の構築

(i) H鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、クローニングしたマウスH鎖V領域をコードするDNAをPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1-S1(配列番号7)はV領域のリーダー配列の5'側をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozak コンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及び制限酵素Hind IIIの認識配列を有するように設計した。前方プライマーMBC1-a(配列番号8)はJ領域の3'側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライスドナー配列及び制限酵素BamHIの認識配列を有するように設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq(宝酒造)を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.07 μ gのプラスミドMBC1H04、プライマーとしてMBC1-aおよびMBC1-S1をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用して50 μ lの鋳油を上層し、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%NuSieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0156】437bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素BamHI、Hind III(宝酒造)により37 $^{\circ}$ C 1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

【0157】上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードするDNAを含むHind III-BamHI DNA断片

*【0153】このような事実に基づき、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表2に示すごとく決定した。なお、L鎖V領域のCDR1~3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号59~61に示し、H鎖V領域のCDR1~3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号62~64に示した。

【0154】

【表2】

V領域	配列番号	CDR1	CDR2	CDR3
H鎖V領域	57	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	65	23-34	50-60	93-105

をHind IIIおよびBamHIで消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するためプライマーM13 Primer M4およびM13 Primer RVをプライマーとして、ダイターミネーターサイクルシーケンシングキット(Perkin-Elmer)を用い、DNAシーケンサー373A(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードするDNAを含有し、5'側にHind III認識配列及びKozak配列、3'側にBamHI認識配列を持つプラスミドをMBC1H/pUC19と命名した。

【0158】(ii) cDNAタイプのマウスヒトキメラH鎖を作製するためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したマウスH鎖V領域をコードするDNAをPCR法により修飾した。H鎖V領域を修飾するための後方プライマーMBC1HVS2(配列番号9)はV領域のリーダー配列の最初をコードする配列の2番のアスパラギンをグリシンに変換し、且つKozak コンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)並びにHind IIIおよびEcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域を修飾するための前方プライマーMBC1HVR2(配列番号10)はJ領域の3'側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、C領域の5'側の配列をコードしApa IおよびSma I認識配列を有するように設計した。

【0159】PCRはTaKaRa Ex Taq(宝酒造)を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6 μ gのプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taqを2.5U、0.25mMのdNTPを含む条件で、添付の緩衝液を使用して、50 μ lの鋳油を上層して94 $^{\circ}$ C 1分間、55 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1%Sea Kem GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳

動により分離した。456bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mMEDTA 溶液20 μ lに溶解した。

【0160】得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素EcoRI およびSmaI (宝酒造)により37℃で1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードするDNAを含むEcoRI-SmaI DNA断片を、EcoRI およびSmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4 及びM13 Primer RVをプライマーとして、ダイナーミネーターサイクルシーケンシングキット(Perkin-Elmer)を用い、DNAシーケンサー373A(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードするDNAを含有し、5'-側にEcoRI およびHind III認識配列及びKoza k 配列、3'-側にApa I およびSmaI認識配列を持つプラスミドをMBC1Hv/pUC19と命名した。

【0161】(iii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C γ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域IgG1のゲノムDNA (N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクターDHFR- Δ E-RVh-PM-1-f (W092/19759参照) と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域のDNAおよびヒト抗体L鎖 κ 鎖C領域のゲノムDNAをコードする発現ベクターRV1-PM1a (W092/19759参照) とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRVh-PM1f-cDNAと命名した。

【0162】DHFR- Δ E-RVh-PM-1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind III部位、およびEF-1 α プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるEcoRI 部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。

【0163】pRVh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-BamHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI 部位が欠失したDHFR- Δ E-RVh-PM1-f をHind III

およびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

【0164】ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA /pUC19と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含み、5'-末端にEcoRI およびHind III認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。

【0165】プラスミドMBC1HcDNA/pUC19をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現ベクターpCOS1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA /pCOS1と命名した。なお、発現ベクターpCOS1は、HEF-PMh-g γ 1 (W092/19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造)を連結することにより構築した。

【0166】さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラスミドMBC1HcDNA/pUC19をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体H鎖配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCHO1と命名した。なお、発現ベクターpCHO1は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (W092/19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造)を連結することにより構築した。

【0167】(2) ヒトL鎖定常領域の構築

(i) クローニングベクターの作製

ヒトL鎖定常領域を含むpUC19 ベクターを構築するために、Hind III部位欠失pUC19 ベクターを作製した。pUC19 ベクター2 μ gを20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8UのHind III (宝酒造)を含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿により回収した。

【0168】回収したDNAを50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6UのKlenowフラグメント (GIBCO BRL)を含有する50 μ lの反応混合液中で室温にて20分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクターDNAをエタノール沈殿により回

収した。

【0169】回収したベクターDNAを50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl₂、1mM ATP、1mM DTT、5% (v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 UのT4 DNAリガーゼ (GIBCO BRL)を含有する反応混合液10μl中で16℃で2時間反応させ、自己連結させた。反応混合液5μlを大腸菌JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100μlに加え、氷上で30分間静置した後、42℃にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。SOC培地500μlを加えて、37℃で1時間インキュベーションした後、X-gal とIPTGを表面に塗布した2×YT寒天培地 (50μg/ml アンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にまき、37℃で一晩培養して形質転換体を得た。

【0170】形質転換体を、50μg/ml アンピシリンを含有する2×YT培地20mlで37℃一晩培養し、菌体画分からPlasmid Mini Kit (QIAGEN)を用いて、添付の処方に従ってプラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドをHind IIIで消化し、Hind III部位が欠失していることを確認したプラスミドをpUC19 ΔHind IIIと命名した。

【0171】(ii)ヒトL鎖λ鎖定常領域をコードするDNAの構築

ヒト抗体L鎖λ鎖C領域は、Mcg+ Ke+ Oz-、Mcg- Ke- Oz-、Mcg- Ke+ Oz+、Mcg+ Ke- Oz- の少なくとも4種類のアイソタイプが知られている (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)。#23-57-137-1 マウスL鎖λ鎖C領域と相同性を有するヒト抗体L鎖λ鎖C領域をEMBLデータベースで検索した結果、アイソタイプがMcg+ Ke+ Oz- (accession No. X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) のヒト抗体L鎖λ鎖が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1 マウスL鎖λ鎖C領域との相同性はアミノ酸配列で64.4%、塩基配列で73.4%であった。

【0172】そこで、このヒト抗体L鎖λ鎖C領域をコードするDNAの構築を、PCR法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA シンセサイザー (ABI社)を用いて行った。HLAMB1 (配列番号11) およびHLAMB3 (配列番号13) はセンスDNA配列を有し、HLAMB2 (配列番号12) およびHLAMB4 (配列番号14) はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23bpの相補的配列を有する。

【0173】外部プライマーHLAMBS (配列番号15)、HLAMBR (配列番号16) はHLAMB1、HLAMB4とそれぞれ相同な配列を有しており、またHLAMBSはEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、HLAMBRはEcoRI 認識配列をそれぞれ含んでいる。第一PCRでHLAMB1-HLAMB2 とHLAMB3-HLAMB4

の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

【0174】PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を使い、添付の処方に従って行った。第一PCRでは、5pmole のHLAMB1および0.5pmole のHLAMB2と5UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する100μlの反応混合液、あるいは0.5pmoleのHLAMB3および5pmole のHLAMB4と5UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する100μlの反応混合液を用い、50μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行った。第二PCRは、反応液を50μlずつ混合し、50μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで3回行った。第三PCRは、反応液に外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを各50pmole ずつ添加し、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0175】第三PCR産物のDNA断片を3%低融点アガロースゲル (NuSieve GTG Agarose, FMC) で電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、添付の処方に従ってゲルから回収、精製した。得られたDNA断片を50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、8UのEcoRI (宝酒造) を含有する20μlの反応混合液中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液8μlに溶解した。

【0176】プラスミドpUC19 ΔHind III 0.8μgを同様にEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。消化したプラスミドpUC19 ΔHind IIIを50mM Tris-HCl (pH9.0)、1mM MgCl₂、アルカリホスファターゼ (E. coli C75, 宝酒造) を含有する反応混合液50μl中で37℃、30分間反応させ脱リン酸処理 (BAP処理) した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿により回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液10μlに溶解した。

【0177】上記のBAP処理したプラスミドpUC19 ΔHind III 1μlと先のPCR産物4μlとを、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を50μg/ml アンピシリンを含有する2×YT培地2mlで一晩培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

【0178】上記プラスミドについて、クローニングされたDNAの塩基配列の確認を行った。塩基配列の決定には373A DNAシーケンサー (ABI社) を用い、プライマーにはM13 プライマー M4 およびM13 プライマーRV (宝

酒造)を用いた。その結果、クローニングされたDNAの内部に12bpの欠失があることが判明した。このDNAを含むプラスミドをCλΔ/pUC19と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマーHCLMS (配列番号17)、HCLMR (配列番号18)を新たに合成し、PCRで再度正しいDNAの構築を行った。

【0179】第一PCRで欠失DNAを含むプラスミドCλΔ/pUC19を鋳型とし、プライマーHLAMBSとHCLMR、HCLMSとHLAMB4で反応を行った。PCR産物をそれぞれ精製し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMB4を添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

【0180】第一PCRでは、鋳型としてCλΔ/pUC19 0.1μg、プライマーHLAMBSおよびHCLMR 各50pmole、あるいはHCLMS およびHLAMB4各50pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

【0181】PCR産物HLAMBS-HCLMR(236bp)、HCLMS-HLAMB4(147bp)をそれぞれ3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。第二PCRでは精製DNA断片各40ng、1 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する20 μlの反応混合液を用い、25 μlの鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行った。

【0182】第三PCRでは、第二PCR反応液2 μl、外部プライマーHLAMBS、HLAMB4各50pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鋳油を上層した。PCRは、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物である357bpのDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【0183】得られたDNA断片0.1μgをEcoRIで消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19ΔHind IIIにサブクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換し、50 μg/ml アンピシリンを含有する2×YT培地2mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドについて塩基配列をM13 プライマー M4、M13 プライマーRV (宝酒造)を用い、373A DNAシーケンサー(ABI社)にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをCλ/pUC19とした。

【0184】(iii) ヒトL鎖κ鎖定常領域をコードするDNAの構築

プラスミドHEF-PM1k-gk (W092/19759)からL鎖κ鎖C

領域をコードするDNA断片を、PCR法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA シンセサイザー(ABI社)を用いて合成した前方プライマーHKAPS (配列番号19)はEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、後方プライマーHKAPA (配列番号20)はEcoRI 認識配列を有するように設計した。

【0185】鋳型となるプラスミドHEF-PM1k-gk 0.1 μg、プライマーHKAPS、HKAPA 各50pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鋳油を上層した。94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の反応を30サイクル行った。360bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【0186】得られたDNA断片をEcoRIで消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19ΔHind IIIにクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換し、50 μg/ml アンピシリンを含有する2×YT培地2mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドの塩基配列をM13 プライマー M4、M13 プライマー RV (宝酒造)を用い、373A DNAシーケンサー(ABI社)にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをCκ/pUC19とした。

【0187】(3) キメラ抗体L鎖発現ベクターの構築
キメラ#23-57-137-1 抗体L鎖発現ベクターを構築した。プラスミドCλ/pUC19、Cκ/pUC19のヒト抗体定常領域の直前にあるHind III、BlnI部位に、#23-57-137-1 L鎖V領域をコードするDNAを連結することによって、それぞれキメラ#23-57-137-1 抗体L鎖V領域およびL鎖λ鎖またはL鎖κ鎖定常領域をコードするDNAを含むpUC19ベクターを作製した。EcoRI消化によってキメラ抗体L鎖をコードするDNAを切り出し、HEF発現ベクターへサブクローニングを行った。

【0188】すなわち、プラスミドMBC1L24から#23-57-137-1 抗体L鎖V領域をコードするDNAを、PCR法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394DNA/RNA シンセサイザー(ABI社)を用いて行った。後方プライマーMBCCHL1 (配列番号21)はHind III認識配列とKozak 配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)を、前方プライマーMBCCHL3 (配列番号22)はBglII、EcoRI 認識配列を有するように設計した。

【0189】PCRは、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.1 μgのMBC1L24、プライマーとしてMBCCHL1 およびMBCCHL3を各50pmole、1 μlのAmpliTaQ(PERKIN ELMER)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鋳油を上層して94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。

【0190】444bp のPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。PCR産物1 μ lをそれぞれ10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、8 UのHind III (宝酒造) および8 UのEcoRI (宝酒造) を含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液8 μ lに溶解した。

【0191】プラスミドpUC19 1 μ gを同様にHind III およびEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ(E.coli C75, 宝酒造) でBAP処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

【0192】BAP処理したプラスミドpUC19 1 μ lと先のPCR産物4 μ lをDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造)を用いて連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)に前述と同様に形質転換した。これを、50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT寒天培地にまき、37℃で一夜培養した。得られた形質転換体を、50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで37℃で一夜培養した。菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドをCHL/pUC19 とした。

【0193】プラスミドC λ /pUC19、C κ /pUC19 各1 μ gをそれぞれ20mM Tris-HCl(pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8 UのHind III (宝酒造) および2 UのBlnI (宝酒造) を含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、37℃で30分間BAP処理を行った。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

【0194】#23-57-137-1 L鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドCHL/pUC19 から8 μ gを同様にHind IIIおよびBlnIで消化した。得られた409bpのDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

【0195】このL鎖V領域DNA 4 μ lを、BAP処理したプラスミドC λ /pUC19 またはC κ /pUC19 各1 μ lにサブクローニングし、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを

有する2 \times YT培地3mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドMBC1L(λ)/pUC19、MBC1L(κ)/pUC19 とした。プラスミドMBC1L(λ)/pUC19 およびMBC1L(κ)/pUC19 をそれぞれEcoRI で消化し、3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bpのDNA断片をGENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

【0196】発現ベクターとしてプラスミドHEF-PM1k-gk 2.7 μ gをEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収した。回収したDNA断片をBAP処理した後、1%低融点アガロースゲルで電気泳動し、6561bpのDNA断片をGENECLEAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

【0197】BAP処理したHEFベクター2 μ lを上記プラスミドMBC1L(λ)またはMBC1L(κ) EcoRI 断片各3 μ lと連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

【0198】精製したプラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8 UのHind III (宝酒造) および2 UのPvuI (宝酒造) を含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれMBC1L(λ)/neo、MBC1L(κ)/neo とした。

【0199】(4) COS-7細胞のトランスフェクション
キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミドMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L(λ)/neo、またはMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L(κ)/neoとの組み合わせでGene Pulser 装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS (一)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10 μ gを加え、1,500 V、25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgG ウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDME M培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。ま

た、C O S - 7 細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPSIIキット (BioRad) を用いてキット添付の処方に従って行った。

【0200】(5) E L I S A

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISA プレートを用意して調製した。ELISA 用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を、固相化バッファー (0.1M NaHCO₃、0.02% NaN₃) で1 μg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100 μl で固相化し、200 μl の希釈バッファー (50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1MNaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% 牛血清アルブミン (BSA)、pH7.2) でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたC O S 細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートし、PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100 μl を加えた。1時間室温にてインキュベートし、PBS-Tween20 で洗浄の後、1mg/ml の基質溶液 (Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio Rad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1 λ Purified (The BindingSite)を用いた。

【0201】(ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を、固相化バッファーで1 μg/mlの濃度に調製したヒトPTHrP (1-34) (ペプチド研究所) 100 μl で固相化した。200 μl の希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたC O S 細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートし、PBS-Tween20 で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100 μl を加えた。室温にてインキュベートし、PBS-Tween20 で洗浄の後、1mg/ml の基質溶液 (Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio Rad) で測定した。

【0202】その結果、キメラ抗体は、ヒトPTHrP (1-34) に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された (図4)。また、キメラ抗体においてL鎖C領域がλ鎖あるいはκ鎖のいずれであっても抗体のPTHrP (1-34) に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖λ鎖を用いて構築した。

【0203】(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞 (DXB11) に導入した。すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞

用発現プラスミドMBC1HcDNA/pCHO1とMBC1L(λ)/neo、またはMBC1HcDNA/pCHO1とMBC1L(κ)/neoとの組み合わせで、Gene Pulser 装置 (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収してエレクトロポレーションに用いた。PBS (-) 中に1×10⁷細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10 μgを加え、1,500 V、25 μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清 (GIBCO) を添加したMEM-α培地 (GIBCO) に懸濁し、3枚の96穴プレート (Falcon) を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) および500mg/mlのGENETICIN (G418Sulfate、GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM-α培地 (GIBCO) の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

【0204】樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のUltra Law IgG ウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 μmのフィルター (Millipore) により細胞破片を除去した。CHO細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROS プロテインAカラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、Con Sep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

【0205】〔実施例3〕ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体H鎖の構築

(i) ヒト型化H鎖V領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフトイングにより作製した。ヒト抗体S31679(NBRF-PDB, Cuisinier A.M.ら, Eur.J.Immunol.,23,110-118,1993)由来のFRを有するヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖 (バージョン" a") の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフトイングプライマーMBC1HGP1 (配列番号23) 及びMBC1HGP3 (配列番号24) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフトイングプライマーMBC1HGP2 (配列番号25) 及びMBC

1 HGP 4 (配列番号 26) はアンチセンス DNA 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 15 から 21 bp の相補的配列を有する。外部プライマー MBC 1 HVS 1 (配列番号 27) 及び MBC 1 HVR 1 (配列番号 28) は CDR グラフティングプライマー MBC 1 HGP 1 及び MBC 1 HGP 4 とホモロジーを有する。

【0206】CDR-グラフティングプライマー MBC 1 HGP 1、MBC 1 HGP 2、MBC 1 HGP 3 および MBC 1 HGP 4 は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出は crush and soak 法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にて行った。

【0207】すなわち、それぞれ 1 nmol の CDR-グラフティングプライマーを 6% 変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさの DNA 断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak 法にてゲルから回収し 20 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA 溶液に溶解した。PCR は、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、100 μ l の反応混合液に上記の様に調製した CDR-グラフティングプライマー MBC 1 HGP 1、MBC 1 HGP 2、MBC 1 HGP 3 および MBC 1 HGP 4 をそれぞれ 1 μ l、0.25 mM の dNTP 並びに 2.5 U の TaKaRa Ex Taq を含む条件で、添付緩衝液を使用して 94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、55 $^{\circ}$ C にて 1 分間、72 $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行った。さらに 50 pmol の外部プライマー MBC 1 HVS 1 及び MBC 1 HVR 1 を加え、同じ温度サイクルを 30 回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を 4% NuSieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0208】421 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN I Kit (BioL0101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA 溶液 20 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を、BamHI および HindIII で消化することにより調製した pUC19 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを hMBC1Hv/pUC19 と命名した。

【0209】(ii) ヒト型化 H 鎖 cDNA のための H 鎖 V 領域の構築

ヒト H 鎖 C 領域 Cy1 の cDNA と連結するために、上記のようにして構築したヒト型化 H 鎖 V 領域の DNA を PCR 法により修飾した。後方プライマー MBC 1 HVS 2 は V 領域のリーダー配列の 5' 側をコードする配

列とハイブリダイズし、且つ Kozak コンセンサス配列 (Kozak, M, ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)、HindIII および EcoRI 認識配列を有するように設計した。H 鎖 V 領域の DNA を修飾するための前方プライマー MBC 1 HVR 2 は、J 領域の 3' 側をコードする DNA 配列にハイブリダイズし、且つ C 領域の 5' 側の配列をコードし ApaI および SmaI 認識配列を有するように設計した。

【0210】PCR は TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、鋳型 DNA として 0.4 μ g の hMBC1Hv/pUC19 を用い、プライマーとして MBC 1 HVS 2 および MBC 1 HVR 2 をそれぞれ 50 pmol、2.5 U の TaKaRa Ex Taq、0.25 mM の dNTP を含む条件で添付緩衝液を使用し、94 $^{\circ}$ C にて 1 分間、55 $^{\circ}$ C にて 1 分間、72 $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。PCR 法により増幅した DNA 断片を 3% NuSieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0211】456 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN I Kit (BioL0101) を用い、キット添付の処方に従い DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA 溶液 20 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を、EcoRI および SmaI で消化することで調製した pUC19 にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたハイブリドマ #23-57-137-1 に由来するマウス H 鎖 V 領域をコードする DNA を含有し、5' 側に EcoRI および HindIII 認識配列及び Kozak 配列、3' 側に ApaI および SmaI 認識配列を持つプラスミドを hMBC1Hv/pUC19 と命名した。

【0212】(2) ヒト型化抗体 H 鎖の発現ベクターの構築

hPM1 抗体 H 鎖 cDNA の配列を含むプラスミド RVh-PM1f-cDNA を ApaI および BamHI にて消化し、H 鎖 C 領域をコードする塩基配列を含む DNA 断片を回収し、ApaI および BamHI で消化することにより調製した hMBC1Hv/pUC19 に導入した。こうして作製したプラスミドを hMBC1HcDNA/pUC19 と命名した。このプラスミドはヒト型化 #23-57-137-1 抗体の H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域 Cy1 をコードする DNA を含み、5'-末端に EcoRI および HindIII 認識配列、3'-末端に BamHI 認識配列を持つ。プラスミド hMBC1HcDNA/pUC19 に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン "a" の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号 58 に示す。また、バージョン a のアミノ酸配列を配列番号 56 に示す。

【0213】hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片を、EcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。

【0214】さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片を、EcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCHO1と命名した。

【0215】(3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築
(i) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体の作製
ヒト型化抗体とマウス(キメラ)抗体のFR領域を組み換えたL鎖をコードするDNAを構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflIII切断部位を利用することによって、FR1及び2はヒト抗体由来、FR3及び4はマウス抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。

【0216】プラスミドMBC1L(λ)/neo及びhMBC1L(λ)/neo各10 μ gを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v) BSA, AflIII(宝酒造)10Uを含有する反応混合液100 μ l中で37℃にて1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(c1とする)および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(h1とする)および1022bpの断片(h2とする)を、GENECLAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。回収したc1, h1断片各1 μ gについてBAP処理を行った。DNAをフェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液10 μ lに溶解した。

【0217】BAP処理したc1及びh1断片1 μ lをそれぞれh2, c2断片4 μ lに連結し(4℃、一夜)、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAPrep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

【0218】精製したプラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂及び1mM DTT並びにApaLI(宝酒造)2U、BamHI(宝酒造)8U又はHindIII(宝酒造)8Uを含

有する反応混合液20 μ l中で37℃、1時間消化した。c1-h2が正しく連結されていれば、ApaLIで5560/1246/498bp、BamHI/HindIIIで7134/269bpの消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。

【0219】ヒトFR1, 2/マウスFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをh/mMBC1L(λ)/neoとした。一方、h1-c2のクローンが得られなかったため、pUCベクター上で組換えしてからHEFベクターにクローニングした。その際、アミノ酸置換のないヒト型化抗体L鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドhMBC1La λ /pUC19、及びFR3内の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに置換したヒト型化抗体L鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドhMBC1Ld λ /pUC19を鋳型として用いた。

【0220】プラスミドMBC1L(λ)/pUC19、hMBC1La λ /pUC19及びhMBC1Ld λ /pUC19の各10 μ gを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v) BSA, HindIII16U, AflIII4Uを含有する反応混合液30 μ l中で37℃、1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/pUC19から215bp(c2'), プラスミドhMBC1La λ /pUC19およびhMBC1Ld λ /pUC19からそれぞれ3218bp(ha1', hd1')のDNA断片をGENECLAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

【0221】ha1', hd1'断片をそれぞれc2'断片に連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAPrep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。ha1', hd1'断片を含むプラスミドを、それぞれプラスミドm/hMBC1La λ /pUC19、m/hMBC1Ld λ /pUC19とした。

【0222】得られたプラスミドm/hMBC1La λ /pUC19、m/hMBC1Ld λ /pUC19をEcoRIで消化した。それぞれ743bpのDNA断片を2%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLAN II Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。

【0223】各DNA断片4 μ lを前述のBAP処理したHEFベクター1 μ lに連結し、大腸菌JM109コ

ンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

【0224】精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl (pH 8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, HindIII (宝酒造) 8U, PvuI (宝酒造) 2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、プラスミドの確認を行った。これらを、それぞれマウスFR1, 2/ヒトFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクター-m/hMBC1La λ /neo、m/hMBC1Ld λ /neoとした。

【0225】(ii) FR1/FR2ハイブリッド抗体の作製

CDR1内にあるSnaBI切断部位を利用することによって、同様にFR1とFR2のハイブリッド抗体を作製した。プラスミドMBC1L(λ)/neo及びh/mMBC1L(λ)/neoの各10 μ gを10mM Tris-HCl (pH 7.9), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01% (w/v) BSA, SnaBI (宝酒造) 6Uを含有する反応混合液20 μ l中で、37℃にて1時間消化した。次に20mM Tris-HCl (pH 8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.01% (w/v) BSA, PvuI 6Uを含有する反応混合液50 μ l中で37℃にて1時間消化した。

【0226】反応液を1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミドMBC1L(λ)/neoから4955bp (m1) および2349bp (m2)、プラスミドh/mMBC1L(λ)/neoから4955bp (hm1) および2349bp (hm2)の各DNA断片を、GENECLEAN II Kit (BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA溶液40 μ lに溶解した。

【0227】m1, hm1断片1 μ lをそれぞれhm2, m2断片4 μ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/ml アンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT及びApaI (宝酒造) 8UまたはApaLI (宝酒造) 2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化し

た。

【0228】各断片が正しく連結されていれば、ApaIで7304bp、ApaLIで5560/1246/498bp (m1-hm2)、ApaIで6538/766bp、ApaLIで3535/2025/1246/498bp (hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。ヒトFR1/マウスFR2, 3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをhmmMBC1L(λ)/neo、マウスFR1/ヒトFR2/マウスFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをmhmMBC1L(λ)/neoとした。

【0229】(4) ヒト型化抗体L鎖の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフトイングにより作製した。ヒト抗体HSU03868 (GEN-BANK, Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994)由来のFR1, FR2およびFR3、並びにヒト抗体S25755 (NBRF-PDB)由来のFR4を有するヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖(バージョン"a")の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。

【0230】CDR-グラフトイングプライマーMBC1LGP1 (配列番号29) 及びMBC1LGP3 (配列番号30) はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフトイングプライマーMBC1LGP2 (配列番号31) 及びMBC1LGP4 (配列番号32) はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1LVS1 (配列番号33) 及びMBC1LVR1 (配列番号34) はCDRグラフトイングプライマーMBC1LGP1及びMBC1LGP4とホモロジーを有する。

【0231】CDR-グラフトイングプライマーMBC1LGP1, MBC1LGP2, MBC1LGP3およびMBC1LGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

【0232】すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフトイングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し、20 μ lの10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA溶液に溶解した。

【0233】PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、100 μ lの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフトイングプライマーMBC1

LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4をそれぞれ1μl、0.25mMのdNTP並びに2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で、添付緩衝液を使用して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、この反応混合液に50pmoleの外部プライマーMBC1LVS1及びMBC1LVR1を加え、さらに同じ温度サイクルで30回反応させた。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products)

を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。
 【0234】421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物を、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドをhMBC1/pUC19と命名した。しかしながらCDR4の104位(Kabatの規定によるアミノ酸番号96位)のアミノ酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正するための修正プライマーMBC1LGP10R(配列番号35)を設計し、合成した。PCRはTaKaRa Taq(宝酒造)を用い、100μlの反応混合液に鋳型DNAとして0.6μgのプラスミドhMBC1/pUC19、プライマーとしてMBC1LVS1及びMBC1LGP10Rをそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq(宝酒造)0.25mMのdNTPを含む条件で添付の緩衝液を使用して50μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0235】421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

【0236】M13 Primer M4プライマー及びM13 Primer RVプライマーを用いて塩基配列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドをHindIIIおよびBlnIで消化し、416bpの断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離した。GENECLEANII Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物を、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製し

たプラスミドCλ/pUC19に導入し、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19と命名した。このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAをプラスミドpCOS1に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Laλ/pCOS1と命名した。ヒト型化L鎖バージョン"a"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)を配列番号66に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号47に示す。

【0237】バージョン"b"をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン"b"では43位(Kabatの規定によるアミノ酸番号43位)のグリシンをプロリンに、49位(Kabatの規定によるアミノ酸番号49位)のリジンをアスパラギン酸に変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP5R(配列番号36)とプライマーMBC1LVS1により、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、pUC19のBamHI、HindIII部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素HindIIIおよびAflIIで消化し、HindIIIおよびAflIIで消化したhMBC1Laλ/pUC19と連結した。

【0238】こうして得られたプラスミドをhMBC1Lbλ/pUC19とし、このプラスミドをEcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAを含む断片をプラスミドpCOS1に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lbλ/pCOS1と命名した。

【0239】バージョン"c"をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン"c"では84位(Kabatの規定によるアミノ酸番号80位)のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP6S(配列番号37)とプライマーM13 Primer RVによりプラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HIで消化したhMBC1Laλ/pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lcλ/pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lcλ/pC

OS1と命名した。

【0240】バージョン"d"、"e"及び"f"をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に"a"、"b"、"c"バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP11R(配列番号38)とプライマーM-S1(配列番号44)によりそれぞれhMBC1Laλ/pCOS1、hMBC1Lbλ/pCOS1、hMBC1Lcλ/pCOS1を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。塩基配列決定後、HindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したCλ/pUC19と連結した。

【0241】こうして得られたプラスミドを順にhMBC1Ldλ/pUC19、hMBC1Leλ/pUC19、hMBC1Lfλ/pUC19とした。これらのプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Ldλ/pCOS1、hMBC1Leλ/pCOS1、hMBC1Lfλ/pCOS1と命名した。

【0242】バージョン"g"及び"h"をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に"a"、"d"バージョンの36位(Kabatの規定によるアミノ酸番号36位)のヒスチジンをチロシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP9R(配列番号39)およびM13 Primer Rをプライマーとして用いて、hMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物とM13 Primer M4をプライマーとして用いて、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてさらにPCRを行った。得られたDNA断片をHindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することで調製したプラスミドCλ/pUC19にサブクローニングした。このプラスミドを鋳型として、プライマーMBC1LGP13R(配列番号40)とMBC1LVS1をプライマーとしたPCRを行った。得られたPCR断片をApaIおよびHindIIIで消化し、ApaIおよびHindIIIで消化したプラスミドhMBC1Laλ/pUC19およびhMBC1Ldλ/pUC19に導入した。塩基配列を決定し、正しい配列を含むプラスミドを順にhMBC1Lgλ/pUC19およびhMBC1Lhλ/pUC19とし、これらのプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラ

スミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Lgλ/pCOS1およびhMBC1Lhλ/pCOS1と命名した。

【0243】バージョン"i"、"j"、"k"、"l"、"m"、"n"および"o"をPCR法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S(配列番号41)とプライマーVIRV(λ)(配列番号43)によりプラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をApaIおよびBlnIで消化し、ApaIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドhMBC1Lgλ/pUC19にサブクローニングした。塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pUC19(x=i, j, k, l, m, n, o)とし、このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pCOS1(x=i, j, k, l, m, n, o)と命名した。バージョン"j"、"l"、"m"および"o"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号67、68、69、70に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号48、49、50、51に示す。

【0244】バージョン"p"、"q"、"r"、"s"および"t"は、バージョン"i"、"j"、"m"、"l"または"o"のアミノ酸配列の87位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3内にある制限酵素Aor51MI切断部位を利用して、バージョン"h"を、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l"または"o"とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミドhMBC1Lxλ/pCOS1(x=i, j, m, l, o)中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpを除き、ここに発現プラスミドhMBC1Lhλ/pCOS1中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpをつなぐことにより91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンとなるようにした。塩基配列決定を行い、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l"および"o"の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンに置換されたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ"p"、"q"、"s"、"r"および"t"とし、得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pCOS1(x=p, q, s, r, t)と命名した。バージョン"q"、

61

r”、“s”および“t”の塩基配列（対応するアミノ酸を含む）をそれぞれ配列番号71、72、73、74に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号52、53、54、55に示す。

【0245】プラスミドhMBC1Lqλ/pCOS1をHindIIIおよびEcoRIで消化し、Hind*

62

*IIIおよびEcoRIで消化したプラスミドpUC19にサブクローニングし、プラスミドhMBC1Lqλ/pUC19と命名した。ヒト型化L鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表3に示す。

【0246】

【表3】

配列表における置換アミノ酸の位置
(Kabatsの規定によるアミノ酸番号)

バージョン	36	43	45	47	49	80	87
a							
b		P			D		
c						P	
d		P			D		I
e						P	I
f	Y						I
g	Y						
h	Y		K				
i	Y		K		D		
j	Y		K	V	D		
k	Y		K	V	D		
l	Y			V	D		
m	Y			V	D		
n	Y				D		I
o	Y		K		D		I
p	Y		K		D		I
q	Y				D		I
r	Y		K		D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

【0247】表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラギン酸、Iはイソロイシンを示す。

【0248】なお、前記プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19およびhMBC1Lqλ/pUC19を有する大腸菌は、それぞれEscherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) および Escherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) についてはFERM BP-5629、Escherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) についてはFERM BP-5630としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0249】(5) COS-7細胞へのトランスフェクション

ハイブリッド抗体およびヒト型化#23-57-137-1抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。すなわちL鎖ハイブリッド抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とh/mMBC1L(λ)/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1Laλ/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1Ldλ/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とhmm

MBC1L(λ)/neo、またはhMBC1HcDNA/pCOS1とhmmMBC1L(λ)/neoとの組み合わせを、GenePulser装置(BioRad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に1×10⁷細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10μgを加え、1,500V、25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltraLowIgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

【0250】ヒト型化#23-57-137-1抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とhMBC1Lxλ/pCOS1(x=a~t)のいずれかの組み合わせをGenePulser装置(BioRad)を用いて、前記ハイブリッド抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。また、COS-7細胞の培養上清からのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPSIIキット(BioRad)を用いて、キット添付の処方に従って行った。

【0251】(6) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO₃、0.02% NaN₃)で1μg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100μlで固相化し、200μlの希釈バッファー(50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% 牛血清アルブミン(BSA)、pH7.2)でブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100μlを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(BioRad)で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1λ Purified(The Binding Site)を用いた。

【0252】(ii)抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1μg/mlの濃度に調製したヒトPTHrP(1-34)100μlで固相化した。200μlの希釈バッファーでブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100μlを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(BioRad)で測定した。

【0253】(7) 活性確認

(i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン"a"とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPTHrP結合能が同等であった(図5)。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバージョン"a"で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン"a"をヒト型化抗体のH鎖として供した。

【0254】(ii)ハイブリッド抗体の活性

(ii-a) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体L鎖がh/mMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、m/hMBC1Lλあるいはm/h

MBC1Ldλの場合はいずれもキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した(図6)。これらの結果は、FR3, 4はヒト型化抗体として問題ないが、FR1, 2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

【0255】(ii-b)FR1/FR2ハイブリッド抗体L鎖がmhmMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、hmmMBC1L(λ)の場合はキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した(図7)。これらの結果は、FR1, 2のうちFR1はヒト型化抗体として問題ないが、FR2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

【0256】(iii)ヒト型化抗体の活性

L鎖としてバージョン"a"から"t"の各々一つを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン"j"、"l"、"m"、"o"、"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のPTHrP結合能を示した(図8~11)。

【0257】(8)CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lmλ/pCOS1、またはhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lqλ/pCOS1、あるいはhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lrλ/pCOS1との組み合わせで、Gene Pulser装置(BioRad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に1×10⁷細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA10μgを加え、1,500V、25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%ウシ胎児血清(GIBCO)を添加したMEM-α培地(GIBCO)に懸濁し、96穴プレート(Falcon)を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN(G418Sulfate, GIBCO)添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含のMEM-α選択培地(GIBCO)に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

【0258】樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のUltra Low Ig G ウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含のMEM- α 選択培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 μ mのフィルター (Millipore) にて細胞破片を除去した。CHO細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROS プロテインA カラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

【0259】〔実施例4〕中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉腫細胞株ROS17/2.8-5細胞を用いて行った。すなわち、ROS17/2.8-5細胞を、10%牛胎児血清 (GIBCO) を含むHam's SF-12培地 (GIBCO) 中に、CO₂ インキュベーターで培養した。ROS17/2.8-5細胞を96穴プレートに10⁴細胞/100 μ l/穴で蒔込み、1日間培養し、4mMのヒドロコルチゾンと10%牛胎児血清を含むHam's SF-12培地 (GIBCO) に交換する。さらに3ないし4日間培養した後、260 μ lのHam's SF-12培地 (GIBCO) にて洗浄し、1mMのイソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX, SIGMA) および10%の牛胎児血清と10mMのHEPESを含む80 μ lのHam's SF-12を加え、30分間37℃でインキュベートした。

【0260】中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ10 μ g/ml、3.3 μ g/ml、1.1 μ g/mlおよび0.37 μ g/mlの群、10 μ g/ml、2 μ g/ml、0.5 μ g/mlおよび0.01 μ g/mlの群、または10 μ g/ml、5 μ g/ml、1.25 μ g/ml、0.63 μ g/mlおよび0.31 μ g/mlの群に段階希釈し、4 ng/mlに調製したPTHrP (1-34) と等量混合し、各抗体とPTHrP (1-34) との混合液80 μ lを各穴に添加した。各抗体の最終濃度は、上記抗体濃度の4分の1になり、PTHrP (1-34) の濃度は、1 ng/mlになる。10分間室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBSにて3回洗浄した後、100 μ lの0.3%塩酸95%エタノールにて細胞内のcAMPを抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit (CAYMAN CHEMICAL'S) 付属のEIAバッファー120 μ lを添加してcAMPを抽出後、cAMP EIA kit (CAYMAN CHEMICAL'S) 添付の処方に従ってcAMPを測定した。その

結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有するL鎖バージョンのうち、91位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン"q"がもっとも強い中和能を示した (図12~14)。

【0261】〔実施例5〕高カルシウム血症モデル動物での薬効試験(1)

ヒト腫瘍-ヌードマウス移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、PTHrPに対するキメラ抗体およびL鎖バージョン"m"、"r"および"q"を有するヒト型化抗体について高カルシウム血症に対する治療効果を検討した。

【0262】高カルシウム血症モデル動物としてヒト膀胱癌PAN-7 ((財) 実験動物中央研究所より購入) 移植ヌードマウスを用いた。ヒト膀胱癌PAN-7を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの高カルシウム血症を発症する。高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、キメラ抗体およびヒト型化抗体が、ヒト膀胱癌PAN-7によって引き起こされる高カルシウム血症を改善することを、体重および血中カルシウム濃度を指標として評価した。

【0263】ヒト膀胱癌PAN-7の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本チャールズリバー) を用いてin vivoで行った。薬効評価には、5週齢雄性BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本チャールズリバー) を購入し、1週間の馴化の後、6週齢の動物を使用した。高カルシウム血症モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト膀胱癌PAN-7を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、2ないし3週間して腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、腫瘍体積、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、高カルシウム血症モデル動物とした。

【0264】高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。すなわち、上記で作製、群分けした高カルシウム血症モデル動物に、マウス1匹あたり10 μ gまたは30 μ gのPTHrPに対するキメラ抗体またはL鎖バージョンm、rを有するヒト型化抗体を尾静脈内に単回投与した。L鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体は、マウス1匹あたり20 μ gまたは60 μ gを尾静脈内に単回投与した。キメラ抗体およびヒト型化抗体投与後、1日、4日、7日、11日目に血中カルシウム濃度および体重を測定し、各抗体の薬効評価を行った。腫瘍体積は、腫瘍の長径 (a mm) および短径 (b mm) を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により腫瘍体積として算出した。血中カルシウム濃

度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca++/pHアナライザー(CIBA-CORNING)を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

【0265】その結果、キメラ抗体およびL鎖バージョン"m"、"r"および"q"を有するヒト型化抗体を投与することにより、体重および血中カルシウム濃度の速やかな改善および持続性が認められた。このことから、本発明のキメラ抗体およびヒト型化抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症治療薬としての有用性が示された(図15~16)。

【0266】〔実施例6〕高カルシウム血症モデル動物での薬効試験(2)

ヒト腫瘍-ヌードマウス移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、PTHrPに対するキメラ抗体およびL鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体について、高カルシウム血症に対する治療効果を検討した。高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。すなわち、上記で作製、群分けした高カルシウム血症モデル動物に、マウス1匹あたり10μgまたは30μgのPTHrPに対するキメラ抗体またはL鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体を尾静脈内に単回投与した。キメラ抗体およびヒト型化抗体投与後、1日、3日、7日、10日目に血中カルシウム濃度および体重を測定し、各抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca++/pHアナライザー(CIBA-CORNING)を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

【0267】その結果、ヒト膵臓癌PAN-7移植高カルシウム血症モデルにおいて、キメラ抗体およびL鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体を投与することにより、体重および血中カルシウム濃度の速やかな改善および持続性が認められた。このことから、本発明のキメラ抗体およびヒト型化抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症治療薬としての有用性が示された(図17)。

【0268】〔実施例7〕高カルシウム血症モデル動物での薬効試験(3)

ヒト腫瘍-ヌードマウス移植系の高カルシウム血症モデル動物(ヒト肺癌LC-6移植高カルシウム血症モデル)を用いて、PTHrPに対するキメラ抗体およびL鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体について高カルシウム血症に対する治療効果を検討した。高カルシウム血症モデル動物としてヒト肺癌LC-6(財)実験動物中央研究所より購入)移植ヌードマウスを用いた。ヒト肺癌LC-6を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの高カルシウム血症を発症する。

【0269】高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、キメラ抗体およびヒト型化抗体が、ヒト肺癌LC-6によって引き起こされる高カルシウム血症を改善すること

を、体重および血中カルシウム濃度を指標として評価した。ヒト肺癌LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス(日本チャールズリバー)を用いてin vivoで行った。薬効評価には、5週齢雄性BALB/c-nu/nuヌードマウス(日本チャールズリバー)を購入し、1週間の馴化の後、6週齢の動物を使用した。

【0270】高カルシウム血症モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト肺癌LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、2ないし3週間して腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、腫瘍体積、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、高カルシウム血症モデル動物とした。

【0271】高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。すなわち、上記で作製、群分けした高カルシウム血症モデル動物に、マウス1匹あたり10μgまたは30μgのPTHrPに対するキメラ抗体またはL鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体を尾静脈内に単回投与した。キメラ抗体およびヒト型化抗体投与後、1日、3日、6日、10日目に血中カルシウム濃度および体重を測定し、各抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca++/pHアナライザー(CIBA-CORNING)を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

【0272】その結果、ヒト肺癌LC-6移植高カルシウム血症モデルにおいて、キメラ抗体およびL鎖バージョン"q"を有するヒト型化抗体を投与することにより、体重および血中カルシウム濃度の速やかな改善および持続性が認められた。このことから、本発明のキメラ抗体およびヒト型化抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症治療薬としての有用性が示された(図18)。

【0273】〔実施例8〕BIACOREを用いたPTHrPと抗PTHrP抗体の相互作用における速度論的解析

BIACOREを用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。抗原としてPTHrP(1-34+Cys)を用い、C末端部位特異的にセンサーチップ上に固定化し、種々の濃度に調製した精製抗体をアナライズとした。得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーター(結合速度定数k_{ass}及び解離速度定数k_{diss})を算出した。速度論的解析に関して、文献「Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system」(Karlsson, R. et al., (1991) J. Immunol. Methods 145, p229-240.)を参考にした。

【0274】(1)センサーチップへのPTHrP(1-34+C)の固定化

センサーチップCM5(Pharmacia)へPTHrP(1-34+C)を固定化する。ランニングバッファーとしてHBS(10mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005% Surfacta

nt P20) を用い、流速は $5 \mu\text{l}/\text{分}$ とした。センサーチップ CM5 上のカルボキシメチルデキストランのカルボキシル基を $100 \mu\text{l}$ の 0.05M N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)/ 0.2M 塩酸 N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC) のインジェクトおよび $100 \mu\text{l}$ の 80mM 塩酸 2-(2-ピリジニルジチオ) エタンアミン(PDEA)/ 0.1M ホウ酸緩衝液 pH8.5 のインジェクトにより活性化した。引き続き、 $10 \mu\text{l}$ の $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ PTHrP (1-34+C)/ 10mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 をインジェクトし、PTHrP(1-34+C) の C 末端の Cys 残基特異的に固定化した。さらに、 $100 \mu\text{l}$ の 50mM (L)-システイン/ 1M NaCl/ 0.1M 蟻酸ナトリウム緩衝液 pH4.3 をインジェクトすることにより、過剰の活性基をブロックした。さらに、 $10 \mu\text{l}$ の 0.1M グリシン-塩酸緩衝液 pH2.5 および $10 \mu\text{l}$ の 10mM 塩酸をインジェクトすることにより、非共有結合をしている物質を洗浄した。このときの PTHrP(1-34+C) の固定量は、 226.4 RU (resonance units) であった (図 19)。

【0275】(2) 固定化 PTHrP(1-34+C) とマウス抗 PTHrP 精製抗体との相互作用

ランニングバッファーとして HBS を用い、流速は $20 \mu\text{l}/\text{分}$ とした。抗体は、ハイブリドーマ細胞を Balb/c マウスに腹水化し、採取した腹水をプロテイン A カラムを用いて精製した。精製した #23-57-137-1 抗体を MBC、精製した 3F5 抗体を 3F5 と表記した。これらの抗体を、HBS を用いて 1.25 、 2.5 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した。分析は、抗体溶液の $40 \mu\text{l}$ をインジェクトする 2 分間を結合相とし、その後 HBS に切り換え、2 分間の解離相とした。解離相終了後、 $10 \mu\text{l}$ の 10mM 塩酸をインジェクトすることにより、センサーチップを再生した。この結合 * 30

MBC および 3F5 のカイネティクスパラメーター

	MBC	3F5
k _{diss} [1/s]	7.38×10^{-5}	1.22×10^{-2}
k _{ass} [1/Ms]	7.23×10^5	6.55×10^5
KD [M]	1.02×10^{-10}	1.86×10^{-8}

【0279】

※ ※ 【表 5】
キメラ抗体およびヒト型化抗体のカイネティクスパラメーター

	chH-ch λ	hMBC _m	hMBC _q
k _{diss} [1/s] ($\times 10^{-4}$)	1.66	3.16	2.32
k _{ass} [1/Ms] ($\times 10^6$)	1.24	0.883	1.03
KD [M] ($\times 10^{-10}$)	1.34	3.58	2.25

【0280】なお、結合速度定数を求める際には、解析モデルタイプ 4 を用いた (BIAevaluation 2.1 Software Handbook, A1~A5)。

【0281】〔実施例 9〕悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルでのリン排泄抑制作用
悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症 (HHM) は腫瘍が産生する PTHrP がその原因物質であり、PTHrP は骨吸収および

*・解離・再生を分析の 1 サイクルとし、各種抗体溶液をインジェクトし、センサーグラムを得た。

【0276】(3) 固定化 PTHrP(1-34+C) とヒト型化抗 PTHrP 精製抗体との相互作用

ランニングバッファーとして HBS を用い、流速は $20 \mu\text{l}/\text{分}$ とした。抗体は、CHO 細胞に産生させ、プロテイン A カラムを用いて精製した。精製したキメラ抗体を chMBC、精製したヒト型化抗体バージョン m を hMBC_m、バージョン q を hMBC_q と表記した。これらの抗体を、HBS を用いて 1.25 、 2.5 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した。分析は、抗体溶液の $40 \mu\text{l}$ をインジェクトする 2 分間を結合相とし、その後 HBS に切り換え、2 分間の解離相とした。解離相終了後、 $10 \mu\text{l}$ の 10mM HCl をインジェクトすることにより、センサーチップを再生した。この結合・解離・再生を分析の 1 サイクルとし、各種抗体溶液をインジェクトし、センサーグラムを得た。

【0277】(4) 相互作用の速度論的解析

目的のデータファイルを読み込み、目的の反応領域について重ね書きによる反応パターンの比較を行った (図 20~24)。さらに、カーブフィッティングによるカイネティクスパラメーター (結合速度定数 k_{ass} および解離速度定数 k_{diss}) の算定を行う BIAcore 専用の解析ソフトウェアである「BIAevaluation 2.1」(Pharmacia) を用いて、相互作用の速度論的解析を行った (表 4~5)。なお、図 20~24 において、各曲線は、図の上方から下方に向かってそれぞれ 1.25 、 2.5 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体濃度のものである。

【0278】

【表 4】

腎尿細管でのカルシウム再吸収を亢進し、高カルシウム血症を惹起することが知られている。一方、リンに関しては、PTHrP は腎尿細管において再吸収を抑制する結果、排泄促進作用を示し、臨床 HHM 患者においてしばしば低リン血症が認められる。そこで、ラット悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルを用いて、ヒト型化抗 PTHrP 抗体の腎におけるリン排泄に対する効果を検討した。

【0282】モデル動物としてヒト肺癌株LC-6（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードラットを用いた。ヒト肺癌株LC-6を皮下移植されたヌードラットは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの高カルシウム血症症状を呈する。本モデルを用い、腎クリアランス法にてヒト型化抗PTHrP抗体の腎におけるリン排泄に対する効果をリン排泄率（後述）を指標に評価した。ヒト肺癌株LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoで行った。薬効評価には、5週齢雄性F344/N Jcl-rnuヌードラット（日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後、6週齢の動物を使用した。

【0283】悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルの作製は、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト肺癌株LC-6腫瘍を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、30日目前後に腫瘍体積が十分に大きくなった（ 3000mm^3 ）のを確認した後、血中カルシウム濃度、体重を指標として悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデル動物とした。腎クリアランス法によるリン排泄の検討は、以下のようにして行った。

【0284】(1) 腎クリアランス法

悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデル動物をペントバルビタール（ネンプタール、大日本製薬(株)）で麻酔し、37℃の保温マット上に背位固定し、採尿用に膀胱カニューレ（ポリエチレンチューブ、PE50、日本ベクトンディッキンソン）を挿入した。次に大腿静脈にインフュージョン用にカニューレ（ポリエチレンチューブ、PE10、日本ベクトンディッキンソン）を挿入し、インフュージョン溶液（組成：0.7% イヌリン、5% マンニトール、0.2% ペントバルビタール、0.9% 塩化ナトリウム）をインフュージョンポンプ（テルフュージョンシリンジポンプ、STC-525、テルモ）にて流速2 ml/hrでインフュージョンした。50分間の平衡化の後、20分間隔で5回（ピリオド-1からピリオド-5まで）の採尿を膀胱カニューレより行い、尿サンプルとした。また各採尿の中間点において、右頸静脈より血液サンプルをヘパリン処理した注射筒にて約0.25ml採取した。

【0285】(2) 抗体の投与

上記したクリアランス実験のピリオド-2の採尿開始時点で、ヒト型化抗PTHrP抗体を1mg/ml/kg 静脈内投与した。

(3) 尿中および血中イヌリンおよびリン濃度測定

ピリオド-1からピリオド-5より得られた尿サンプルは尿量を測定後、イヌリンおよびリン濃度を測定した。また同様に得られた血液サンプルは冷却遠心分離後、血漿サンプルとしてイヌリンおよびリン濃度を測定した。イヌリン濃度はアンスロン-硫酸法（Roe, J.H.ら、J Biol Chem 178, 839-845, 1949）にて測定した。リン濃度は日立自動分析装置7170型にて無機リン測定用試薬、オート

セラIP（第一化学薬品）を用いて、測定のマニュアル通りに測定した（フィスケ・サバロー法）。

【0286】(4) イヌリンクリアランス、リンクリアランスおよびリン排泄率の算出

イヌリンクリアランス（inulin clearance、Cin）、リンクリアランス（phosphate clearance、Cp）およびリン排泄率（fractional excretion of phosphate、FEp）は以下の式により算出した。

【0287】イヌリンクリアランス（inulin clearance、Cin）の算出

$$Cin = Uin V / Pin$$

Cinはイヌリンクリアランス（ml/kg/min）を表す。Uinは尿中イヌリン濃度（mg/ml）を表す。Vは単位時間当たりの尿量（ml/kg/min）を表す。Pinは血中イヌリン濃度（mg/ml）を表す。

【0288】

リンクリアランス（phosphate clearance、Cp）の算出

$$Cp = Up V / Pp$$

Cpはリンクリアランス（ml/kg/min）を表す。Upは尿中リン濃度（mg/ml）を表す。Vは単位時間当たりの尿量（ml/kg/min）を表す。Ppは血中リン濃度（mg/ml）を表す。

【0289】リン排泄率（fractional excretion of phosphate、FEp）の算出

$$FEp = Cp / Cin$$

FEpはリン排泄率を表す。Cinはイヌリンクリアランス（ml/kg/min）を表す。Cpはリンクリアランス（ml/kg/min）を表す。実験は4匹の動物を用いて行った。結果はその平均値±標準誤差で示す。

【0290】リン排泄率および血中リン濃度の結果を図25および図26に示す。図25はクリアランスの各ピリオド（1ピリオドは20分間）と、腎からのリン排泄率（＝リンクリアランス／イヌリンクリアランス）との関係を示すグラフである。なお、ヒト型化抗PTHrP抗体、1mg/kg（i.v.）はピリオド-2のはじめに投与した。

【0291】図26はクリアランスの各ピリオド（1ピリオドは20分間）と、血漿中のリン濃度との関係を示すグラフである。ヒト型化抗PTHrP抗体、1mg/kg（i.v.）はピリオド-2のはじめに投与した。以上の結果より、抗体投与前のリン排泄率（ピリオド-1）に対して、抗体投与後のリン排泄率（ピリオド-2からピリオド-5）は明らかな抑制を示した。すなわち、中和抗体を投与することで、リン排泄亢進（FEp>0.2）により低リン血症状態を呈する病態に対してリン再吸収を正常化レベル（リン再吸収率＝1-FEp>0.8）付近まで回復させ、その結果、血中リン濃度が正常化する傾向が示された。このように、PTHrPが原因で起こるリン排泄亢進や低リン血症などの治療薬として本抗体の有用性が示された。

【0292】PTHrPは悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症の原因物質であるため、PTHrPによるリン排泄の増加や

組織中高エネルギー有機リン酸濃度の低下が予想される。従って、低リン血症を伴う疾患、例えば低リン血性くる病、低リン血性ビタミンD抵抗性くる病などでは尿中へのリン排泄増加が主たる病因であり、本抗体にはこれら疾患の治療薬として有用である。

【0293】〔実施例10〕悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症の臨床諸症状の改善

悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症は腫瘍が産生するPTHrPがその原因物質であり、PTHrPは骨吸収および腎尿細管でのカルシウム再吸収を亢進し、高カルシウム血症を惹起することが知られている。また、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症では、Performance statusの悪化、意識障害、全身倦怠感、口渇感や悪心・嘔吐（食欲不振）などの臨床症状の悪化が認められる。これら臨床症状に対する抗PTHrP抗体の効果をヒト腫瘍—ヌードマウス移植系およびヒト腫瘍—ヌードラット移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて検討した。

【0294】高カルシウム血症モデル動物としてヒト肺癌LC-6（（財）実験動物中央研究所より購入）移植ヌードマウスおよびヌードラットを用いた。ヒト肺癌LC-6を移植されたヌードマウスおよびヌードラットは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体温低下、体重減少や運動量の低下などの高カルシウム血症症状を発症する。

【0295】悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症の一般臨床症状に対するマウス抗PTHrP抗体の改善効果を、ヒト肺癌LC-6—ヌードマウス移植系を用いて写真で示した。また、運動量の改善、体温改善並びに摂食量低下の改善効果は、ヒト肺癌LC-6—ヌードラット移植系を用いて評価した。

【0296】1. 高カルシウム血症に伴う外観上の臨床症状の改善

ヒト肺癌LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoで行った。薬効評価には、5週齢雄性BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後、6週齢の動物を使用した。

【0297】高カルシウム血症モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト肺癌LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、27日目して腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、腫瘍体積、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、高カルシウム血症モデル動物とした。

【0298】腫瘍体積は、腫瘍の長径（a mm）および短径（b mm）を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により腫瘍体積として算出した。血中カルシウム濃度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643自動C

a++/pHアナライザー（CIBA-CORNING）を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

【0299】高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。すなわち、上記で作製、群分けした高カルシウム血症モデル動物に、マウス1匹あたり100 μgのPTHrPに対するマウス抗体を、腫瘍移植後、27、30、34、37日目に尾静脈内に投与した。対照群には、リン酸緩衝生理食塩水を同様に尾静脈内に投与した。抗体投与群並びに対照群の中から典型的な1匹をそれぞれ選び、正常動物とともに、腫瘍移植41日目に写真撮影を行った。

【0300】その結果、ヒト肺癌LC-6移植高カルシウム血症モデルにおいて、抗体投与動物（図27の中央及び図28の中央）は、対照動物（図27の右及び図28の右）と同程度の腫瘍塊を保持するにも関わらず正常動物（図27の左及び図28の左）と同等の外見を呈し、抗PTHrP抗体投与により外見上の臨床症状の改善が認められた（図27及び28）。

【0301】2. 高カルシウム血症に伴う運動量低下の改善

ヒト肺癌株LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoで行った。薬効評価には、5週齢雄性F344/N Jcl-rnuヌードラット（日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後、6週齢の動物を使用した。

【0302】悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルの作製は、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト肺癌株LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、30日目前後に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、血中カルシウム濃度、体重を指標として悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデル動物とした。血中カルシウム濃度は、眼窩よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca++/pHアナライザー（CIBA-CORNING）を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

【0303】(1) 自発運動量測定法

自発運動量の測定は自発運動量測定装置アニメックス（ANIMEX activity meter type SE, FARAD Electronics, Sweden）を用いて、個体毎に個別飼育しているポリ製ケージ（給水、給餌下）を装置の所定の位置に置き行った。この装置はラットの運動量を計測するもので、一定時間当たりのカウントとして記録される。測定は午後7時から翌日午前8時までの13時間行い、測定結果は1時間当たりのカウント数とした。

【0304】(2) 抗体の投与

上記したように高カルシウム血症を発症したラットを用い、ヒト型化抗PTHrP抗体を5mg/0.5ml/kg尾静脈内投与した。また、対照には、生理食塩水を

同様に尾静脈内に投与した。測定は抗体投与個体と対照個体を交互に測定した。測定日は抗体投与個体は抗体投与0（投与前日）、2、4、7、14日目に、また対照個体は1、3、5、8、15日目に行った。その結果、対照個体の自発運動量は実験期間中変化がないかまたは減少傾向を示すのに対して、抗体投与個体は4日目以降自発運動量の増加が認められた（図29）。

【0305】3. 高カルシウム血症に伴う体温低下の改善

ヒト肺癌株LC-6の継代および悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルの作製は、上記2で示した方法と同様に実施した。

(1) 体温測定法

体温の測定はデジタル温度計を用い、個体はペントバルビタール（ネプタール、大日本製薬（株））で麻酔し、温度センサープローブを直腸に挿入して行った。

【0306】(2) 抗体の投与

上記したように高カルシウム血症を発症したラットを用い、ヒト型化抗PTHrP抗体を1mg/ml/kg尾静脈内投与した。また、対照には、生理食塩水を同様に尾静脈内に投与した。さらに、正常ラット（無投与）の体温についても同時に測定した。体温測定は抗体投与個体、対照個体および正常ラットいずれも、投与0（投与当日）、1、2、3日目に行った。

【0307】その結果、正常ラットの体温は実験期間中34.2～34.4℃とほとんど変化なく推移した。悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症ラットでは、正常ラットに比べ、約2℃の体温の低下が認められた。このモデルにヒト型化抗PTHrP抗体を投与すると、投与3日目まで正常ラットの体温まで回復することが確認された。このように、ヒト型化抗PTHrP抗体は悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルでの体温低下に対して改善する作用を有することが示された（図30）。

【0308】4. 高カルシウム血症に伴う摂食量低下の改善

摂食量に及ぼす影響

* ヒト肺癌株LC-6の継代および悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルの作製は、上記2で示した方法と同様に実施した。作製したモデルは血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、以下の実験に使用した。

(1) 摂食量測定法

ラットは実験期間中、個別飼育用の代謝ケージに入れ、給水、給餌下で飼育した。摂食量は当日午前9時から翌日午前9時までの24時間摂食量とし、給餌器の重量を測定し、予め測定した重量（風袋重量）との差をその個体の摂食量（g）とした。

【0309】(2) 抗体の投与

上記したように高カルシウム血症を発症したラット（HHMラット）を用い、ヒト型化抗PTHrP抗体を5mg/0.5ml/kg尾静脈内投与した。また、対照群には、生理食塩水を同様に静脈内に投与した。さらに、正常ラットについても生理食塩水を同様に尾静脈内に投与した。摂食量測定は、抗体投与群、対照群および正常ラット群のいずれも、投与0（投与前日から当日）、1（投与当日から翌日）、3（投与3日目から翌日）、5日目（投与5日目から翌日）に行った。

【0310】その結果、投与前値の摂食量は高カルシウム血症ラット（個体5から9）では平均で8.11gであり、正常ラットは平均12.06gであった。このように明らかに高カルシウム血症ラットでは摂食量の低下が認められた。このモデルにヒト型化抗PTHrP抗体を投与すると、対照群ではあまり摂食量に変化がないのに対して、抗体投与群では投与1日目以降正常ラットの摂食量まで回復することが確認された。このように、ヒト型化抗PTHrP抗体は悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルでの摂食量低下に対して改善する作用のあることが示された（表6）。

【0311】

【表6】

動物	個体番号	投与 ⁽²⁾	個体別摂食量 (g)			
			投与前日	1日目	3日目	5日目
正常ラット	個体1	生理食塩水	13.7	16.7	18.63	18.71
	個体2	生理食塩水	14.27	15.3	19.55	19.39
	個体3	生理食塩水	9.83	15.5	20.72	19.88
	個体4	生理食塩水	10.42	15.04	20.28	22.03
HHM ラット	個体5	生理食塩水	10.77	14.24	12.66	11.82
	個体6	生理食塩水	6.99	8.92	2.59	14.8
HHM ラット	個体7	抗PTHrP抗体	7.46	17.65	22.52	17.99
	個体8	抗PTHrP抗体	12	12.38	20.94	23.1
	個体9	抗PTHrP抗体	3.35	16.65	20.36	21.89

注：生理食塩水投与量は0.5ml/kg 尾静脈投与
抗体投与量は5mg/0.5ml/kg 尾静脈投与

【0312】以上の結果より、本発明のキメラ抗体およびヒト型化抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の臨床諸症状の改善薬としての有用性が示された。

5. 高カルシウム血症に伴う血液pHの改善

ヒト肺癌株LC-6の継代および悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症モデルの作製は、上記2で示した方法と同様に実施した。作製したモデルは血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、以下の実験に使用した。

(1) 血液pH測定法

血液pHは、ヘパリン処理した注射筒を用い、心臓採血法にて血液を採取し、643自動Ca⁺⁺/pHアナライザー(CIBA-CORNING)を用いて血液pHを測定した。

【0313】(2) 抗体の投与

上記したように高カルシウム血症を発症したラット(HHMラット)を用い、ヒト型化抗PTHrP抗体を5mg/0.5ml/kg尾静脈内投与した(n=3)。また、対照群には、生理食塩水を同様に静脈内に投与した(n=2)。血液pH測定は、抗体投与群および対照群のいずれも、投与0(投与当日)、1、7日目に行った。結果は各群ともにその平均値で示した。

【0314】その結果、高カルシウム血症ラットの抗体投与前の血液pHは約7.49であり(正常ラットの血液pHはpH7.40±0.02)、本モデルは明らかに代謝性アルカローシスの病態を示していた。このモデルにヒト型化抗PTHrP抗体を投与すると、対照群ではほとんど血*

配列:

AAATAGCCCT TGACCAGGCA

【0317】配列番号: 2

配列の長さ: 38

配列の型: 核酸

配列:

CTGGTTCCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG

【0318】配列番号: 3

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

配列:

GGATCCCGGG CCACTGCATA GACACATG

【0319】配列番号: 4

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

配列:

GGATCCCGGG TCAGRGGAAG GTGGAACA

【0320】配列番号: 5

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

配列:

GTTTCCAG TCACGAC

【0321】配列番号: 6

配列の長さ: 17

* 液pHの変化はないのに比べ、抗体投与群では投与7日目には正常ラットの血液pHに近い値まで改善していることが確認された。悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症(HHM)における臨床諸症状の一つに腎臓での重炭酸イオン(HCO₃⁻)の排泄阻害に基づく代謝性アルカローシスが報告されている。ヒト型化抗PTHrP抗体の投与は本モデルで血液pHを正常化したことから、HHMで見られる代謝性アルカローシスを改善する作用を有することが示された(図31)。以上の結果より、本発明のキメラ抗体及びヒト型化抗体は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の臨床諸症状を改善するための改善薬として有用であることが示された。

【0315】

【発明の効果】本発明により、PTHrPに対する抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体が提供される。これらの抗体は、ヒトにおける抗原性が低いことから、高カルシウム血症、低リン血症等の治療薬として有用である。

【0316】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

20

※ 鎖の数: 一本鎖

30 トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

38

★ 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

28

☆ 鎖の数: 一本鎖

40 トポロジー: 直鎖状

☆ 配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

29

◆ 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

◆ 配列の種類: 他の核酸(合成DNA)

17

配列の型: 核酸

50 鎖の数: 一本鎖

	(41)	特開平 1 1 - 9 2 5 0 0
79	80	
トポロジー：直鎖状	* * 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： CAGGAAACAG CTATGAC		17
【0322】配列番号：7	※ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：31	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： GTCTAAGCTT CCACCATGAA ACTTCGGGCT C		31
【0323】配列番号：8	★ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：30	10 トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： TGTTGGATCC CTGCAGAGAC ACTGACCAGA		30
【0324】配列番号：9	☆ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：36	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： GTCTGAATTC AAGCTTCCAC CATGGGGTTT GCGCTG		36
【0325】配列番号：10	◆ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：41	20 トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： TTTCCCCGGGC CCTTGGTGGA GGCTGAGGAG ACG GTGACCA G		41
【0326】配列番号：11	* 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：109	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCCACGGTC ACCCTGTTCC CGCCCTCCTC TGAGGAGCTC CAAGCCAACA AGGCCACACT AGTGTCTCT		60 109
【0327】配列番号：12	※ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：110	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： GGTTTGGTGG TCTCCACTCC CGCCTTGACG GGGCTGCCAT CTGCCTTCCA GGCCACTGTC ACAGCTCCCG GGTAGAAGTC ACTGATCAGA CACACTAGTG TGGCCTTCTT		60 110
【0328】配列番号：13	★ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：98	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	★40 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： GGAGTGGAGA CCACCAAACC CTCCAAACAG AGC AACAACA AGTACGCGGC CAGCAGCTAC CTGAGCCTGA CCCCCGAGCA GTGGAAGTCC CACAGAAG		60 98
【0329】配列番号：14	☆ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：106	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列： TGTGAATTC TTACTATGAA CATTCTGTAG GGGCCACTGT CTTCTCCACG GTGCTCCCTT CATGCGTGAC CTGGCAGCTG TAGCTTCTGT GGCATTCCA CTGCTC		60 106

81

82

【0330】配列番号：15

配列の長さ：43

配列の型：核酸

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCC

43

【0331】配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

TGTTGAATTC TTA CTATGAA

20

【0332】配列番号：17

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列：

CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTACCTGAG CCTGACGCC

39

【0333】配列番号：18

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列：

GTAGCTGCTG GCCCGTACT TGTGTTGCT CTGTTTGA

39

【0334】配列番号：19

配列の長さ：46

配列の型：核酸

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTC CTAGGTCGAA CTGTGCTGC ACCATC

46

【0335】配列番号：20

配列の長さ：34

配列の型：核酸

配列：

TGTTGAATTC TTACTAACAC TCTCCCTGT TGAA

34

【0336】配列番号：21

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGC CTGGACTCCT CTCTT

35

【0337】配列番号：22

配列の長さ：48

配列の型：核酸

配列：

TGTTGAATTC AGATCTAACT ACTTACCTAG GACACTGACC TTGCTCCC

48

【0338】配列番号：23

配列の長さ：128

配列の型：核酸

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTGGGCTG AGCTGGGTTT TCCTCGTTGC TCTTTAAGA 60

GGTGTCCAGT GTCAGGTGCA GCTGGTGGAG TCTGGGGGAG GCCTGCTCCA GCCTGGGAGG 120

TCCCTGAG 128

【0339】配列番号：24

配列の長さ：125

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* * 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACCATTAGTA GTGCTGGTAG TTACACCTAC TATCCAGACA GTGTGAAGGG GCGATTACAC 60
 ATCTCCAGAG ACAATTCCAA GAACACGCTG TATCTGCAA TGAACAGCCT GAGAGCTGAG 120
 GACAC 125

【0340】配列番号：25

※ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：132

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTACCACCAC TACTAATGGT TGCCACCCAC TCCAGCCCCT TGCCTGGAGC CTGGCGGACC 60
 CAAGACATGC CATAGCTACT GAAGTGAAT CCAGAGGCTG CACAGGAGAG TCTCAGGGAC 120
 CTCCCAGGCT GG 132

【0341】配列番号：26

★ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：110

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG GTTCCCTGGC CCCAGTAAGC AAAGTAAGTC 60
 ATAGTAGTCT GTCTCGCACA GTAATACACA GCGGTGTCCT CAGCTCTCAG 110

【0342】配列番号：27

☆ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：30

20 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG 30

【0343】配列番号：28

◆ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG

30

【0344】配列番号：29

30* 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：133

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACAAAGCTTC CACCATGGCC TGGACTCCTC TCTTCTTCTT CTTTGTCTTT CATTGCTCAG 60
 GTTCTTTCTC CCAGCTTGTG CTGACTCAAT CGCCCTCTGC CTCTGCCTCC CTGGGAGCCT 120
 CCGTCAAGCT CAC 133

【0345】配列番号：30

※ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：118

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AGCAAGATGG AAGCCACAGC ACAGGTGATG GGATTCCTGA TCGCTTCTCA GGCTCCAGCT 60

CTGGGGCTGA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGTC TGAGGATGAG GCTGACTA 118

【0346】配列番号：31

★ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：128

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTGTGGCTTC CATCTTGCTT AAGTTTCATC AAGTACCGAG GGCCTTCTC TGGCTGCTGC 60
 TGATGCCATT CAATGCTGTA CCGTACTGTC TCGTACTCA AGGTGCAGGT GAGCTTGACC 120

85		86	128
GAGGCTCC			
【0347】配列番号：32		* 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：114		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CCCTCACAAA	60		
TTGTTCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GTAATAGTCA GCCTCATCCT CAGA	114		
【0348】配列番号：33		※ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：17		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		※10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
ACAAAGCTTC CACCATG			17
【0349】配列番号：34		★ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：19		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
CTTGGATCCG GGCTGACCT			19
【0350】配列番号：35		☆ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：75		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		☆20 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA	60		
TTGTTCTTA ATTGT	75		
【0351】配列番号：36		◆ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：43		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
AAAGGATCCT TAAGATCCAT CAAGTACCGA GGGGGCTTCT CTG			43
【0352】配列番号：37		* 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：46		30 トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
ACAAAGCTTA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGCC TGAGGA			46
【0353】配列番号：38		※ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：111		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA	60		
TTGTTCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GATATAGTCA GCCTCATCCT C	111		
【0354】配列番号：39		40★ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：42		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
CTTCTCTGGC TGCTGCTGAT ACCATTCAAT GGTCTACGTA CT			42
【0355】配列番号：40		☆ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：26		トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸		☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）	
配列：			
CGAGGGCCCT TCTCTGGCTG CTGCTG			

【0356】配列番号：41

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列：

GAGAAGGCC CTARGTACST GATGRAWCTT AAGCA

35

【0357】配列番号：42

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列：

CACGAATTCA CTATCGATTG TCGAACCTTC AGAGG

35

【0358】配列番号：43

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列：

GGCTTGAGC TCCTCAGA

18

【0359】配列番号：44

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

GACAGTGGTT CAAAGTTTTT

20

【0360】配列番号：45

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Gly
1				5					10				15	
Ala	Ser	Ala	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
			20						25				30	
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Leu	Lys	Pro	Pro	Lys
			35						40				45	
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
			50						55				60	
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Asp	Arg
			65						70				75	
Tyr	Leu	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Met	Tyr
			80						85				90	
Ile	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
			95						100				105	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
			110						115					

【0361】配列番号：46

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

配列：

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
1				5					10				15	
Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
			20						25				30	
Ser	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu
			35						40				45	

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

◆

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

(46)

特開平 1 1 - 9 2 5 0 0

90

89

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe
 95 100 105
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110 115

【0362】配列番号：47

配列の長さ：116

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 110 115

【0363】配列番号：48

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

※

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
 35 40 45
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0364】配列番号：49

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1					5				10				15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25				30	
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Lys
				35					40				45	
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
				50					55				60	
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg
				65					70				75	
Tyr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr
				80					85				90	
Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
				95					100				105	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				110					115					

【0365】配列番号：50

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

※

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1					5				10				15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25				30	
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg
				35					40				45	
Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
				50					55				60	
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg
				65					70				75	
Tyr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr
				80					85				90	
Tyr	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
				95					100				105	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				110					115					

【0366】配列番号：51

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

★

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1					5				10				15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25				30	
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg
				35					40				45	

(48)

特開平 1 1 - 9 2 5 0 0

94

93

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0367】配列番号：52

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
 35 40 45
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0368】配列番号：53

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

※

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 35 40 45
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
 50 55 60
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
 65 70 75
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
 80 85 90
 Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
 95 100 105
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

【0369】配列番号：54

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

*

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1					5				10				15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25				30	
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Lys
				35					40				45	
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
				50					55				60	
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg
				65					70				75	
Tyr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr
				80					85				90	
Ile	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
				95					100				105	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				110					115					

【0370】配列番号：55

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

※

配列：

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1					5				10				15	
Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Thr
				20					25				30	
Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg
				35					40				45	
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp
				50					55				60	
Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg
				65					70				75	
Tyr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr
				80					85				90	
Ile	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val
				95					100				105	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
				110					115					

【0371】配列番号：56

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

★

配列：

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly
1					5				10				15	
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20					25				30	
Ser	Tyr	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40				45	

(50)

特開平 1 1 - 9 2 5 0 0

97
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe
 95 100 105
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

98

【0372】配列番号：57

* 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：411

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG AAC TTC GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA 45
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys
 -15 -10 -5
 GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAA CTG GTC GAG TCT GGC GGA GAC TTA 90
 Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu
 1 5 10
 CTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA 135
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 15 20 25
 TTC ACT TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG ATT CGC CAG ACT CCA 180
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro
 30 35 40
 GAC AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT 225
 Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser
 45 50 55
 TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC 270
 Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 60 65 70
 AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTA TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG 315
 Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu
 75 80 85
 AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TTT TAC TGT GCA AGA CAG ACT ACT 360
 Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr
 90 95 100
 ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGC ACT CTG GTC ACT GTC 405
 Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 105 110 115
 TCT GCA 411
 Ser Ala

【0373】配列番号：58

* 鎖の数：二本鎖

配列の長さ：411

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GGG TTT GGG CTC AGC TGG GTT TTC CTC GTT GCT CTT TTA AGA 45
 Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg
 -15 -10 -5

99 100
 GGT GTC CAG TGT CAG CTG CTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG 90
 Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
 1 5 10
 GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA 135
 Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 15 20 25
 TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA 180
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 30 35 40
 GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT 225
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser
 45 50 55
 TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC 270
 Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 60 65 70
 AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG 315
 Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 75 80 85
 AGA GCT GAG GAC ACC GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAG ACT ACT 360
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr
 90 95 100
 ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC 405
 Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 105 110 115
 TCC TCA 411
 Ser Ser

【0374】配列番号：59

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10

【0375】配列番号：60

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

【0376】配列番号：61

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly
 1 5 10 15

* 配列：

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

30 【0377】配列番号：62

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Tyr Trp Met Gln
 1 5

【0378】配列番号：63

配列の長さ：16

40 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

101

102

【0379】配列番号：64

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

* 配列の長さ：411

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

【0380】配列番号：65

*

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 -10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAA CTT GTG CTC ACT CAG TCA TCT TCA GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser
 1 5 10
 TTC TCC CTG GGA GCC TCA GCA AAA CTC ACG TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Phe Ser Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
 15 20 25
 CAG CAC AGT ACC TAC ACC ATT GAA TGC TAT CAG CAA CAG CCA CTC 180
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu
 30 35 40
 AAG CCT CCT AAG TAT GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
 Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCT GGA TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGT GCT GAT CGC TAC CTT AGC ATT TCC AAC ATC CAG CCA GAA GAT 315
 Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp
 75 80 85
 CAA GCA ATG TAC ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAT GTT TTC GGC GGT GGG ACC AAG GTC ACT GTC CTA GGT 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

【0381】配列番号：66

配列の長さ：405

配列の型：核酸

40※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 -10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTC ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG ACT ACT 135

103	Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	104
15	20	25
CAG CAC AGT ACC TAC ACC ATT GAA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG	180	
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu		
30	35	40
AAG GGC CCT CGG TAC TTG ATG AAA CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225	
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His		
45	50	55
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270	
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser		
60	65	70
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315	
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp		
75	80	85
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360	
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln		
90	95	100
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTC ACC GTC CTA GGT	405	
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
105	110	1 1 5

【0382】配列番号：67

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA	45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser	
-15	-10
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT	90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser	
1	5
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT	135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser	
15	20
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG	180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu	
30	35
AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC	225
Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His	
45	50
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT	270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	
60	65
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT	315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp	
75	80
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA	360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln	
90	95
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTC ACC GTC CTA GGC	405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	

(54)

特開平 1 1 - 9 2 5 0 0

105

106

105

110

115

CAG CCC 411

Gln Pro

【0383】配列番号：68

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
-15 -10 -5
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
1 5 10
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
15 20 25
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
30 35 40
AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
45 50 55
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
60 65 70
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
75 80 85
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
90 95 100
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGC ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
105 110 115
CAG CCC 411
Gln Pro

```

【0384】配列番号：69

配列の長さ：411

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
-15 -10 -5
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
1 5 10
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
15 20 25
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

```


(55)

特開平 1 1 - 9 2 5 0 0

107
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
 30 35 40
 AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA ACC CAC 225
 Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
 75 80 85
 GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGC ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411
 Gln Pro

108

【0385】配列番号：70

配列の長さ：411

配列の型：核酸

20*鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 -10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
 15 20 25
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA CAG 180
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
 30 35 40
 AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA ACC CAC 225
 Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
 75 80 85
 GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGC ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115

CAG CCC 411

Gln Pro

【0386】配列番号：71

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
          -15          -10          -5
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
          1          5          10
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
          15          20          25
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
          30          35          40
AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
          45          50          55
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
          60          65          70
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
          75          80          85
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
          90          95          100
TTT GTG TAC CTG TTC GGC GGA GGC ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          105          110          115
CAG CCC 411
Gln Pro

```

【0387】配列番号：72

配列の長さ：411

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
          -15          -10          -5
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
          1          5          10
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
          15          20          25
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

```

特開平 1 1-9 2 5 0 0

111																1
30				35				40								
AAG	GGC	CCT	AGG	TAC	CTG	ATC	GAT	CTT	AAG	CAA	GAT	GGA	AGC	CAC	225	
Lys	Gly	Pro	Arg	Tyr	Leu	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His		
45				50				55								
AGC	ACA	GGT	GAT	GGG	ATT	CCT	GAT	CGC	TTC	TCA	GGC	TCC	AGC	TCT	270	
Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser		
60				65				70								
GGG	GCT	GAG	CGC	TAC	CTC	ACC	ATC	TCC	AGC	CTC	CAG	TCT	GAG	GAT	315	
Gly	Ala	Glu	Arg	Tyr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp		
75				80				85								
GAG	GCT	GAC	TAT	ATC	TGT	GGT	GTG	GGT	GAT	ACA	ATT	AAG	GAA	CAA	360	
Glu	Ala	Asp	Tyr	Ile	Cys	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln		
90				95				100								
TTT	GTG	TAC	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAA	CTG	ACC	GTC	CTA	GGC	405	
Phe	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly		
105				110				115								
CAG	CCC	411														
Gln	Pro															

【0388】配列番号：73

配列の長さ： 4 1 1

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

20 トポロジー：直鎖状

* 配列の種類: cDNA to mRNA

配列：

[illegible]

113

114

Gln Pro

【0389】配列番号：74

配列の長さ：411

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
 -15 -10 -5
 GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
 Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
 1 5 10
 GCC TCC CTC GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
 15 20 25
 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TCG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
 Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
 30 35 40
 AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
 Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
 45 50 55
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
 60 65 70
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
 75 80 85
 GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
 Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
 90 95 100
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 105 110 115
 CAG CCC 411

Gln Pro

【0390】配列番号：75

配列の長さ：34

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列：

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile
 1 5 10 15
 Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu
 20 25 30
 Ile His Thr Ala

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗体の模式図である

【図2】CDR-グラフティングの概要を示す図である。

【図3】V領域のFR及びCDRの評価を示す図である。

【図4】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図5】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図6】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図7】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図8】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図9】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

【図10】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

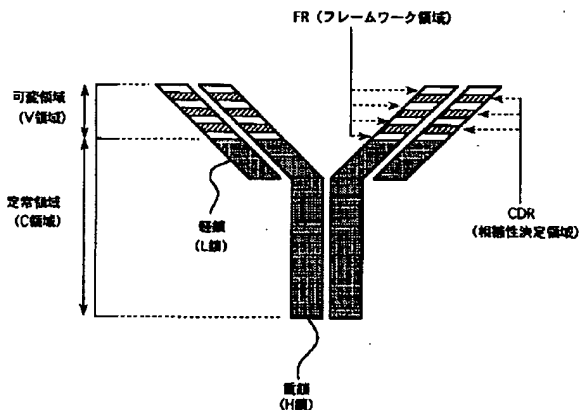
【図11】抗体結合活性の測定結果を示す図である。

- 【図 1 2】 ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。
 【図 1 3】 ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。
 【図 1 4】 ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。
 【図 1 5】 高カルシウム血症モデル動物に対する本発明の抗体の効果を示す図である。
 【図 1 6】 高カルシウム血症モデル動物に対する本発明の抗体の効果を示す図である。
 【図 1 7】 高カルシウム血症モデル動物に対する本発明の抗体の効果を示す図である。
 【図 1 8】 高カルシウム血症モデル動物に対する本発明の抗体の効果を示す図である。
 【図 1 9】 センサーチップへのPTHrP の固定化のセンサーグラムを示す図である。
 【図 2 0】 本発明の抗体の速度論的解析結果を示す図である。
 【図 2 1】 本発明の抗体の速度論的解析結果を示す図である。
 【図 2 2】 本発明の抗体の速度論的解析結果を示す図である。
 【図 2 3】 本発明の抗体の速度論的解析結果を示す図である。

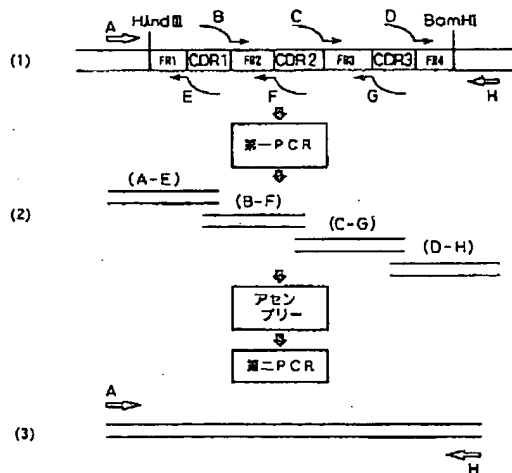
*

- * 【図 2 4】 本発明の抗体の速度論的解析結果を示す図である。
 【図 2 5】 本発明のヒト型化抗体についてリン排泄率に及ぼす影響を試験した結果を示す図である。
 【図 2 6】 本発明のヒト型化抗体について血漿中リン濃度濃度に及ぼす影響を試験した結果を示す図である。
 【図 2 7】 高カルシウム血症マウスに抗PTHrP抗体を投与した後の外見上の臨床諸症状を観察した結果を示す写真である(生物の形態)。
 【図 2 8】 高カルシウム血症マウスに抗PTHrP抗体を投与した後の外見上の臨床諸症状を観察した結果を示す写真である(生物の形態)。
 【図 2 9】 高カルシウム血症モデルを用いて、抗PTHrP抗体投与後の自発運動量の経日変化を、対照群(生理食塩水投与)と比較した図である。
 【図 3 0】 高カルシウム血症モデルを用いて、抗PTHrP抗体投与後の体温の経日変化を、対照群(生理食塩水投与)と比較した図である。
 【図 3 1】 高カルシウム血症モデルを用いて、抗PTHrP抗体投与後の血液pHの経日変化を、対照群(生理食塩水投与)と比較した図である。





【図 1】



【図 2】



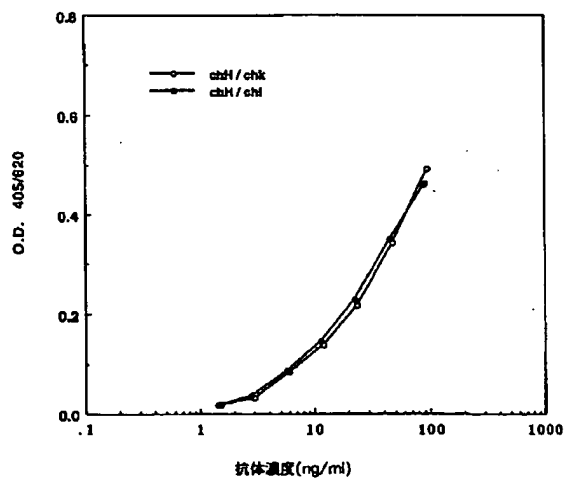
【図3】

V領域				プラスミド	活性
FR1	FR2	FR3	FR4		
					
CDR1	CDR2	CDR3			
H	H	m	m	h/m MBC1L(λ)	-
m	m	H	H	m/h MBC1L(λ)	+
H	m	m	m	hmm MBC1L(λ)	+
m	H	m	m	mhm MBC1L(λ)	-

H: ヒト抗体のFR
m: マウス抗体のFR

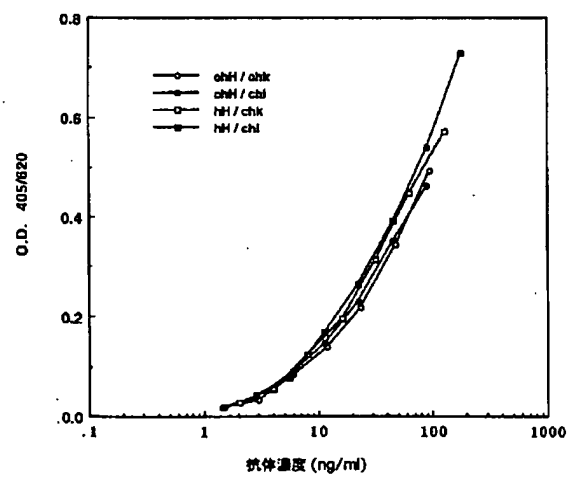
【図4】

抗原結合活性の測定



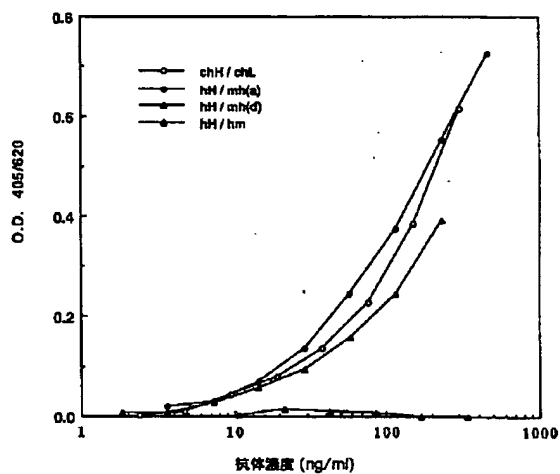
【図5】

抗原結合活性の測定



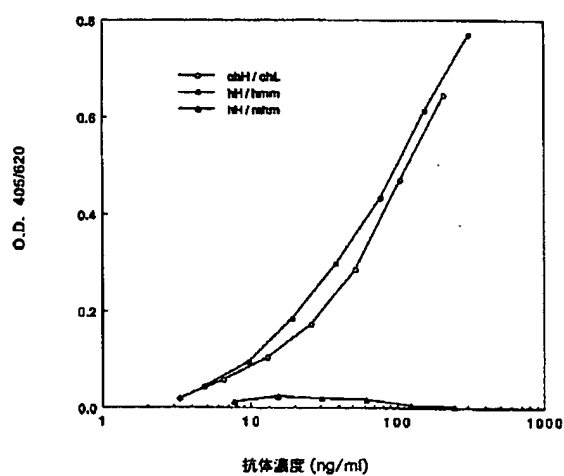
【図6】

抗原結合活性の測定



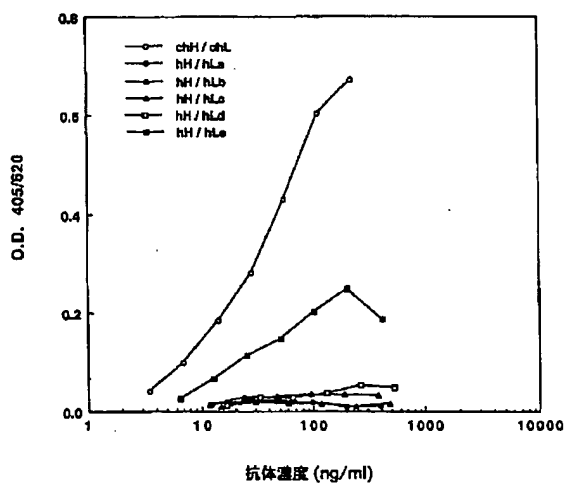
【図7】

抗原結合活性の測定



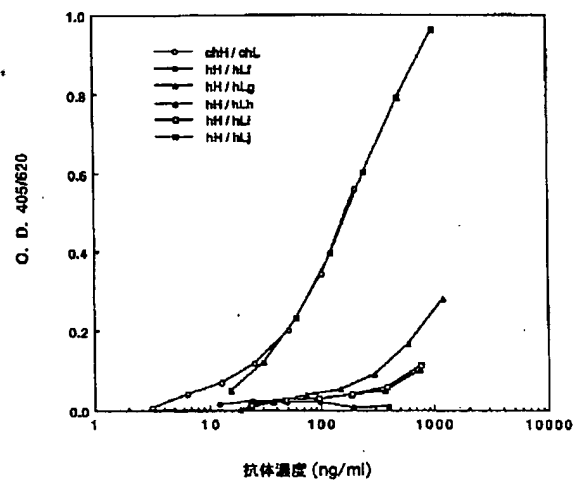
【図8】

抗原結合活性の測定



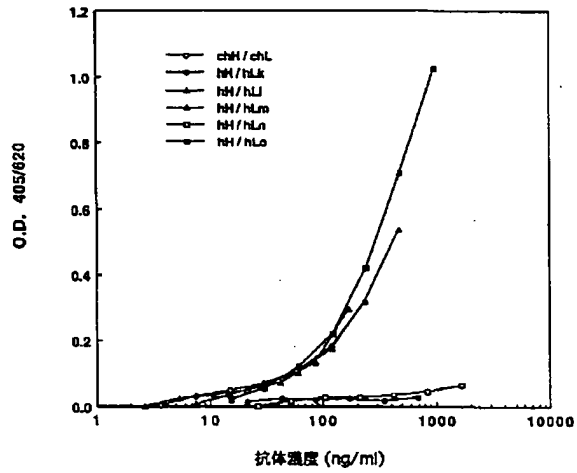
【図9】

抗原結合活性の測定



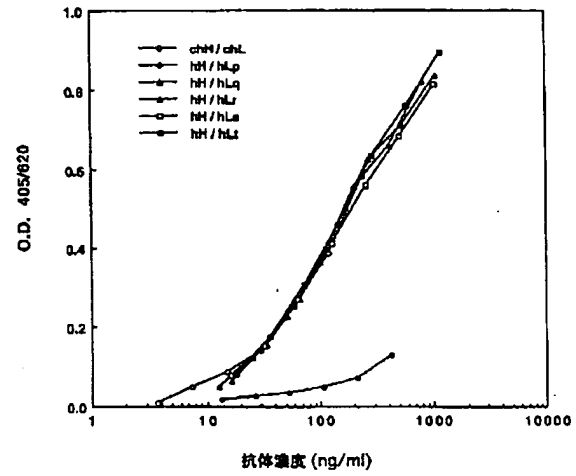
【図10】

抗原結合活性の測定



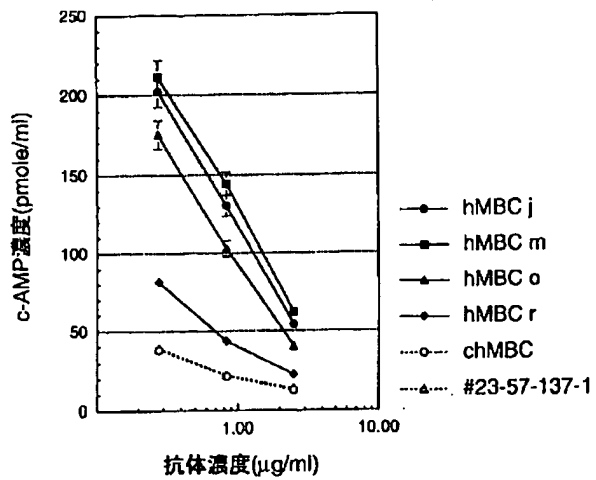
【図11】

抗原結合活性の測定



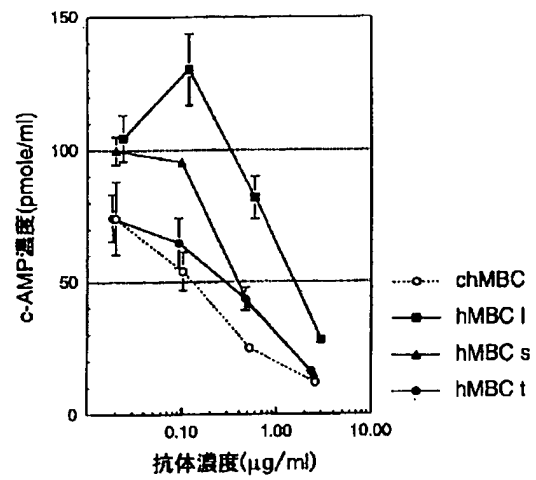
【図12】

ヒト型化抗 PTHrP(1-34) 抗体の中和活性



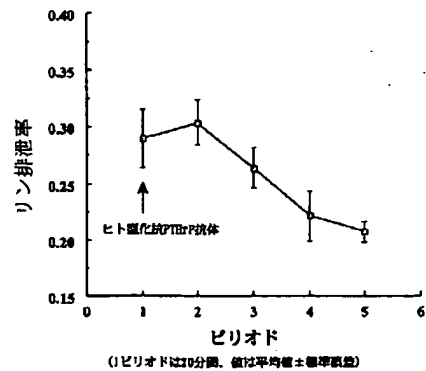
【図13】

ヒト型化抗 PTHrP(1-34) 抗体の中和活性

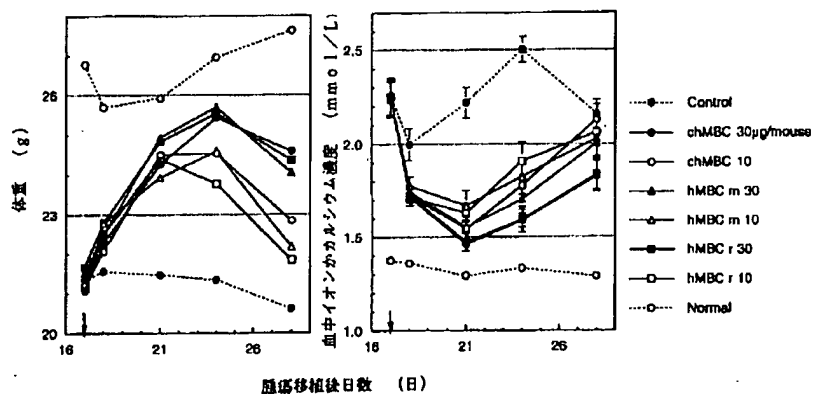


【図 2 5】

リン排泄率に及ぼす影響

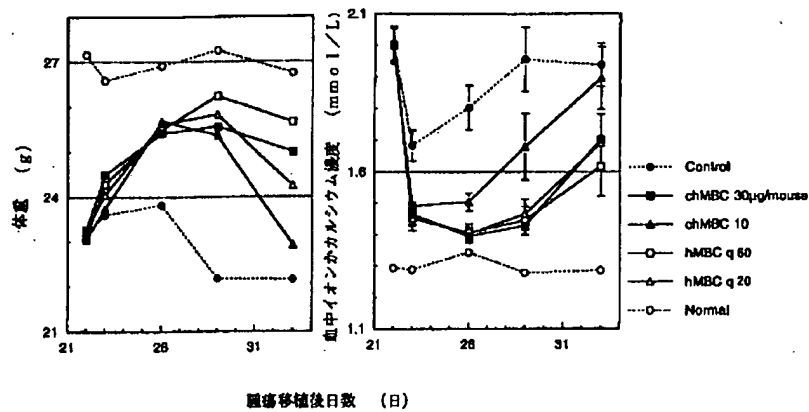


高カルシウム血症モデル動物（ヒト肺癌細胞PAN-7細胞ヌードマウス）
に対するキメラ抗体およびヒト型化抗体の効果



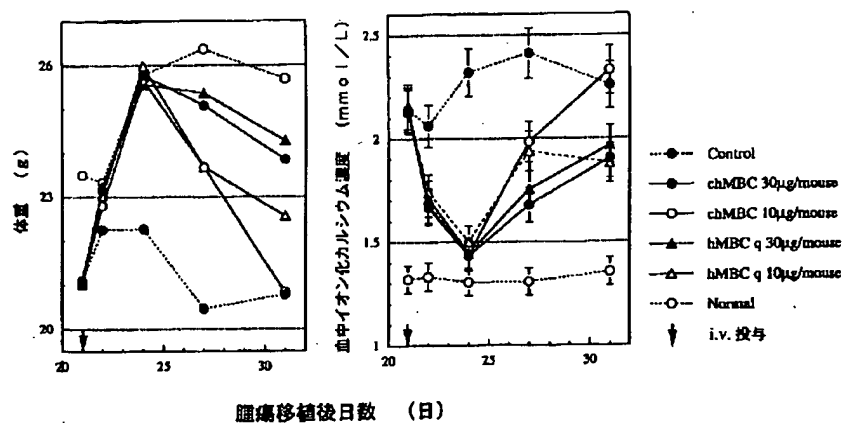
【図16】

高カルシウム血症モデル動物（ヒト膵臓癌PAN-7 肥満ヌードマウス）
に対するキメラ抗体およびヒト型化抗体の効果



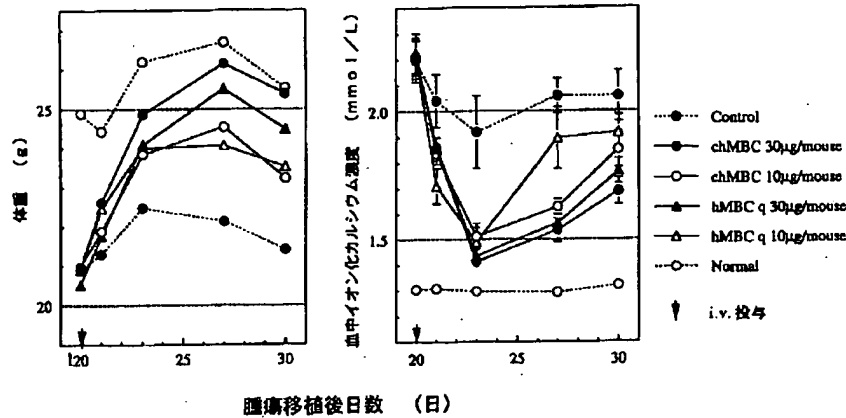
【図17】

高カルシウム血症モデル動物（ヒト膵臓癌PAN-7 担癌
ヌードマウス）に対するキメラ抗体およびヒト型化抗体の効果

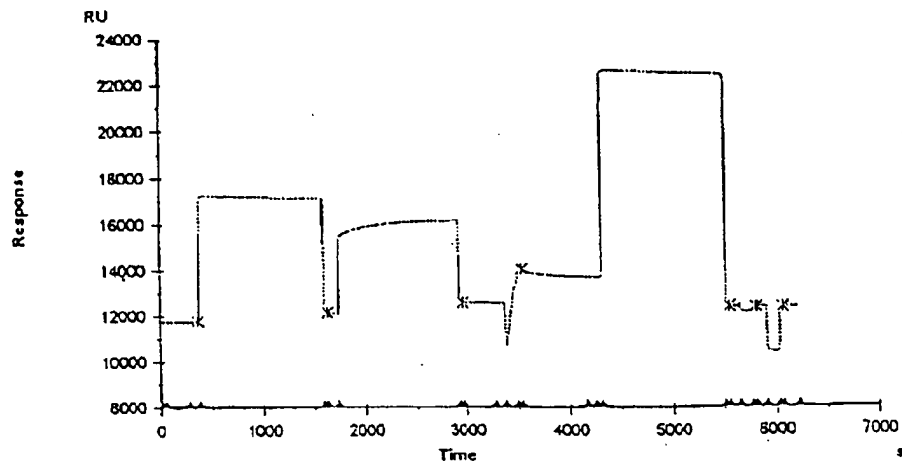


【図18】

高カルシウム血症モデル動物（ヒト肺癌LC-6-JCK担瘤
ヌードマウス）に対するキメラ抗体およびヒト型化抗体の効果



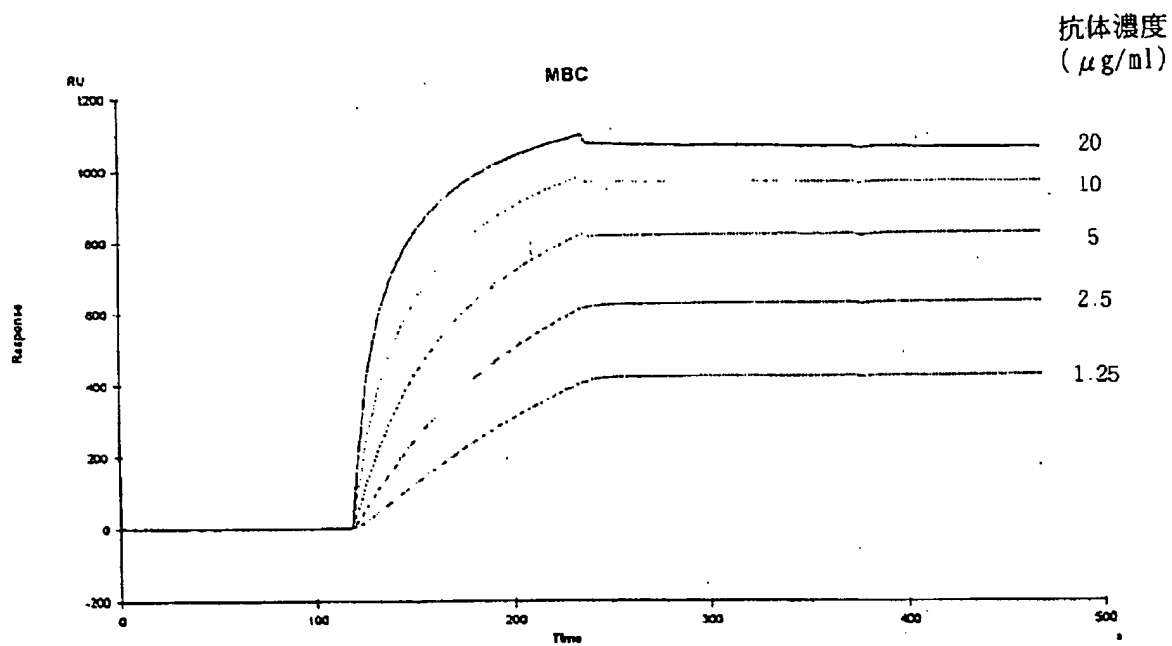
【図19】



Fc	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
2	368.5	5.0	11784.0	0.17	0.07	Yes	0	pre-NHS+EDC
2	1621.5	5.0	12157.3	2.29	-1.22	Yes	373.2	NHS+EDC-100ul
2	2965.5	5.0	12604.9	1.36	-0.71	No	447.6	PDEA-100ul
2	3529.5	5.0	14054.8	8.34	-4.45	No	1901.3	(1-34+C)5ug/ml-10ul-pH5.0
2	5545.5	5.0	12423.6	2.08	-1.10	No	256.3	Cys/NaCl-100ul
2	5803.5	5.0	12396.6	0.28	-0.13	No	239.3	Gly/HCl-10ul
2	5062.5	5.0	12383.6	0.13	0.00	No	226.4	10mM-HCl-10ul

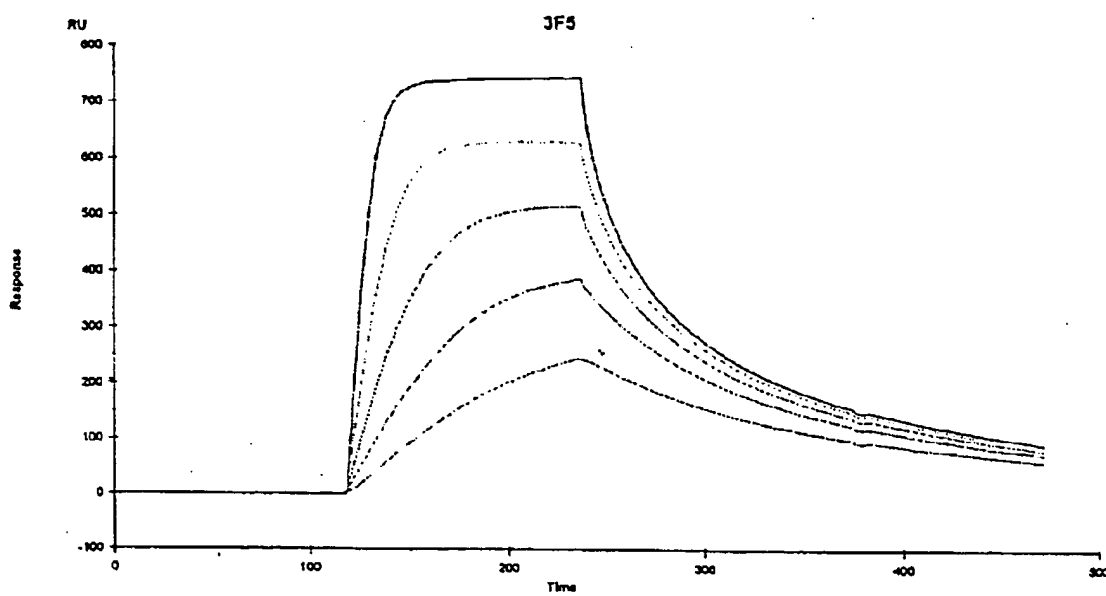
センサーチップへの PTHrP(1-34+C)の固定化のセンサーグラム

【図20】



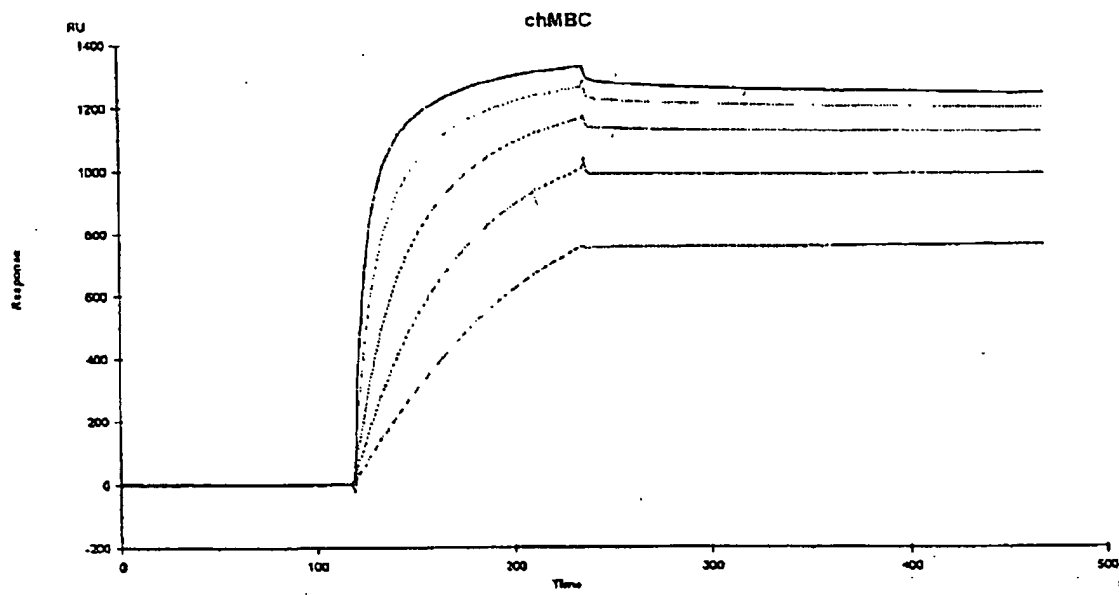
MBC センサーグラム重ね合わせ

【図21】



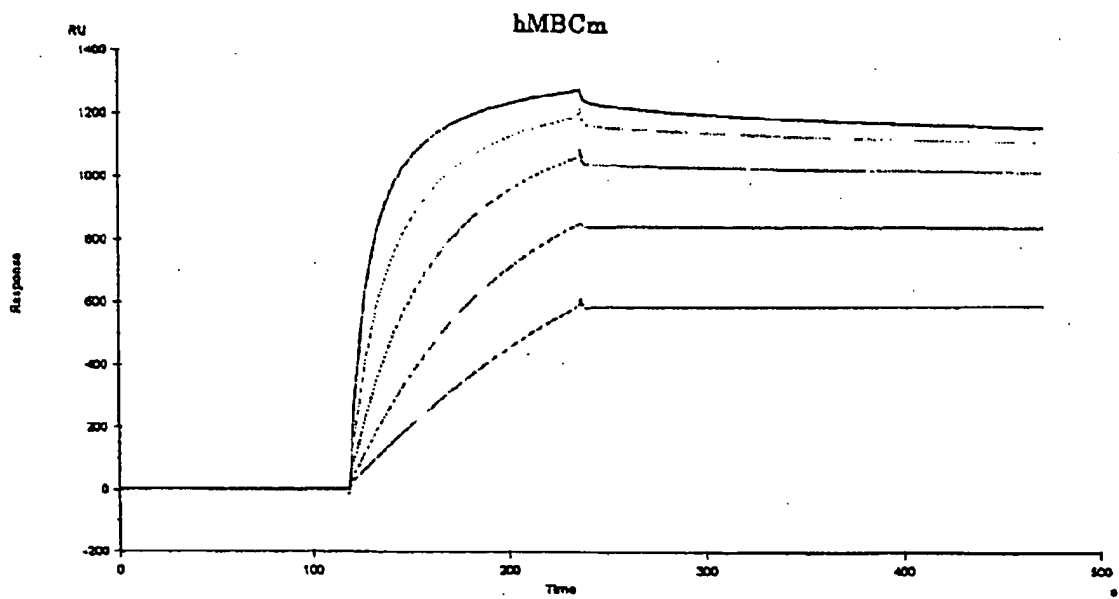
3F5 センサーグラム重ね合わせ

【図22】



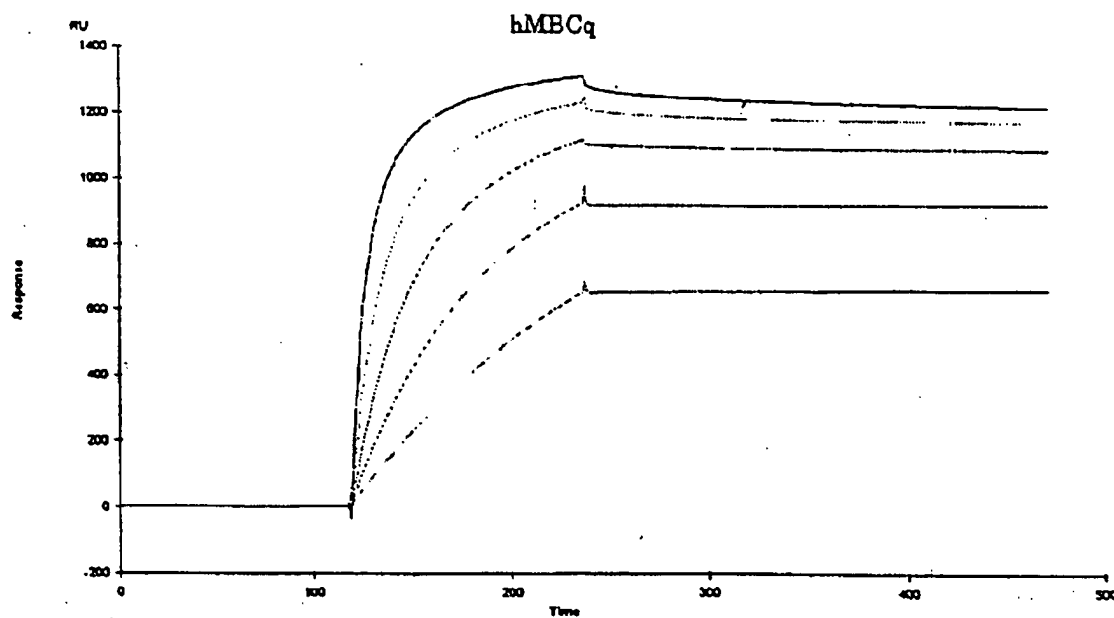
chMBC センサーグラム重ね合わせ

【図23】



hMBCm センサーグラム重ね合わせ

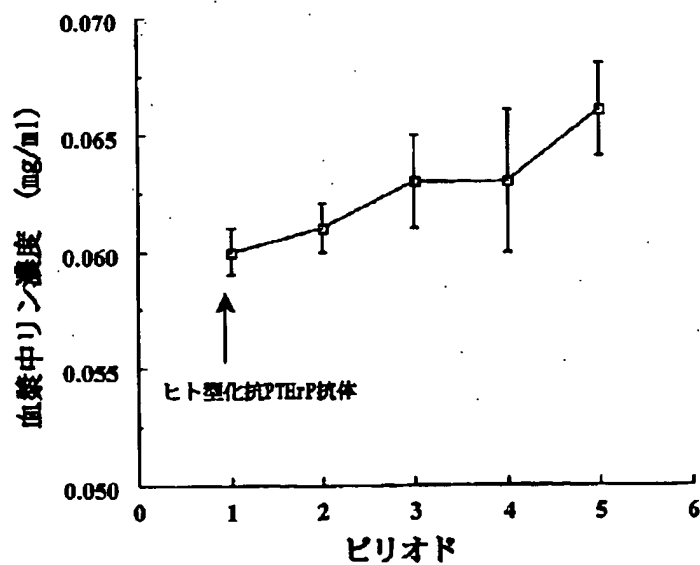
【図24】



hMBCq センサーグラム重ね合わせ

【図26】

血漿中リン濃度に及ぼす影響



(1ピリオドは20分間、値は平均値±標準誤差)

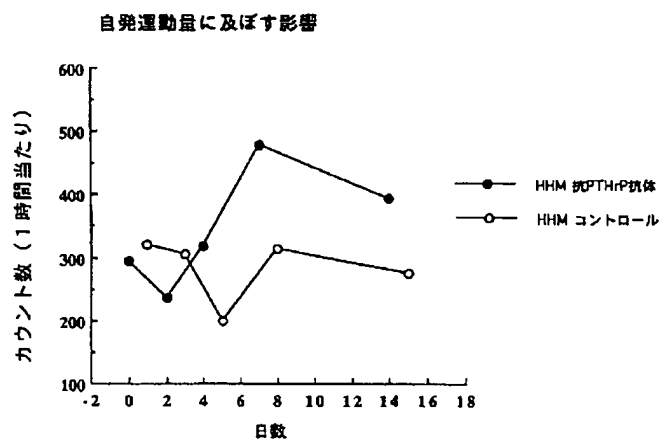
【図27】



【図28】

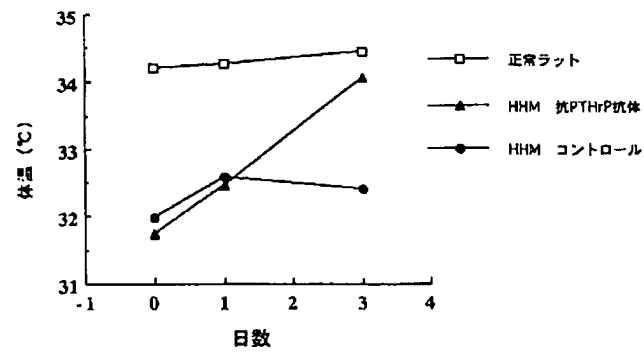


【図29】



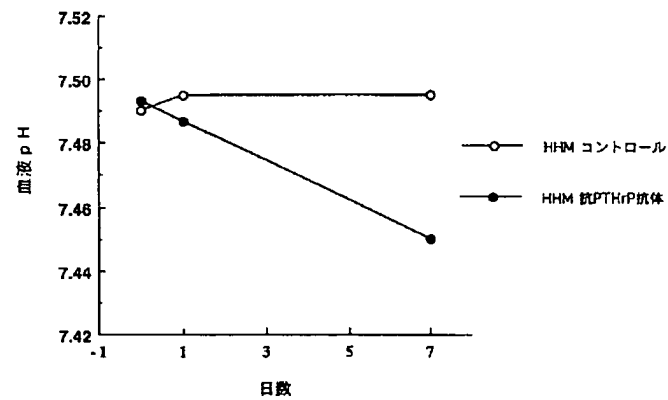
【図30】

体温に及ぼす影響



【図31】

血液pHに及ぼす影響



【手続補正書】

【提出日】平成9年10月13日

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図27

【補正方法】変更

【補正内容】

【図27】

図面代用写真



【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

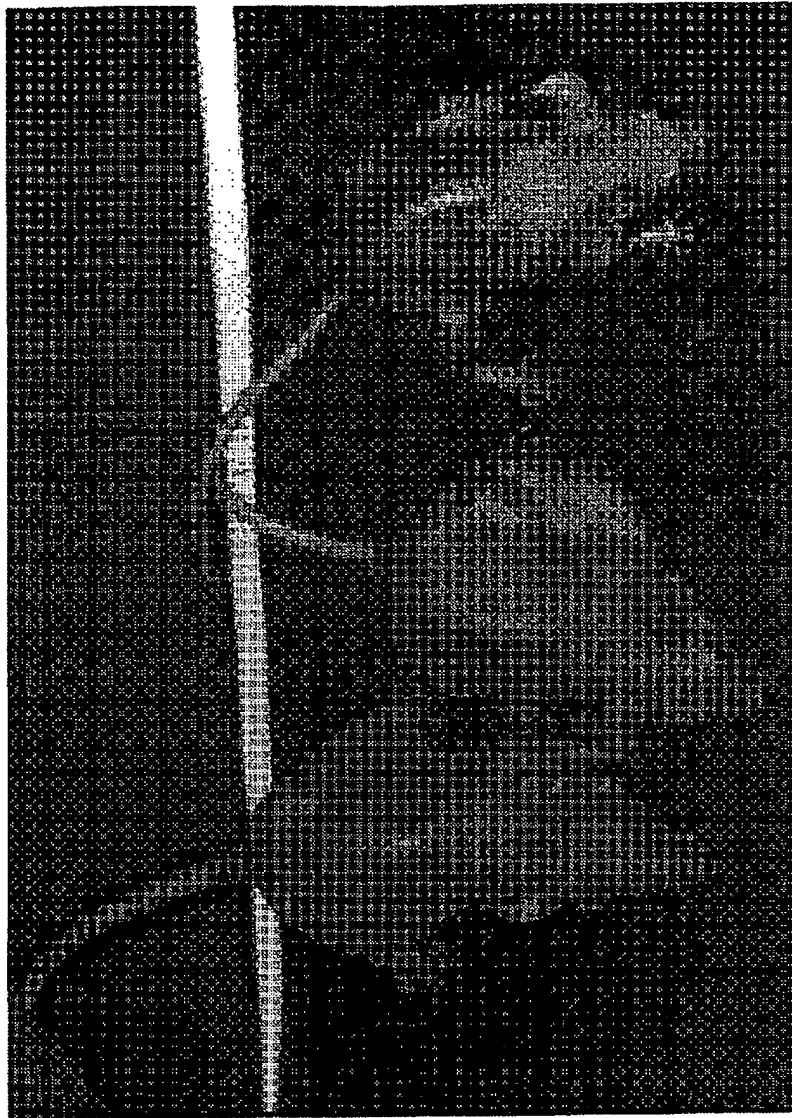
【補正対象項目名】図28

【補正方法】変更

【補正内容】

【図28】

図面代用写真



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C 1 2 N 1/21
5/10
15/02
15/09
C 1 2 P 21/08
// A 6 1 K 38/00
(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 5/10
C 1 2 R 1:91)

識別記号

Z N A

A D D

F I

C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 5/00
15/00

A 6 1 K 37/02

B

C

Z N A A

A D D

(73)

特開平11-92500

(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)



A-13

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 16/18, 16/28, C12N 5/20, A61K 39/395 // C12P 21/08, C12N 15/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/12973</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月18日(18.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04118</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月11日(11.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/264853 1997年9月11日(11.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 福島 直(FUKUSHIMA, Naoshi)[JP/JP] 宇野慎介(UNO, Shinsuke)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MONOCLONAL ANTIBODY INDUCING APOPTOSIS</p> <p>(54)発明の名称 アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体</p> <p>(57) Abstract A monoclonal antibody which is an antibody specifically recognizing human integrin associated proteins and is an antigen inducing the apoptosis of nucleated blood cells having the human integrin associated proteins. Therefore, it is useful as an antibody, which specifically recognizes the human integrin associated proteins, in discriminating and identifying these proteins. Owing to the effect of inducing the apoptosis of nucleated blood cells, the above antibody is also usable as remedies, etc. in the fields of, for example, treating myelocytic leukemia and lymphatic leukemia.</p> <div data-bbox="1088 1176 1331 1848" data-label="Image"> </div>		

(57)要約

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体であり、ヒトIntegrin Associated Proteinを有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髓性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

アポトーシスを誘起するモノクローナル抗体

技術分野

- 5 本発明は、 Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する新規モノクローナル抗体、ならびにその断片、ペプチドおよび低分子化合物、および当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。当該新規抗体は、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

背景技術

- 10 従来、顆粒球コロニー刺激因子、例えば、遺伝子組換え型顆粒球コロニー刺激因子 (rG-CSF) は、主に顆粒球系細胞の分化、増殖を促進させる液性因子として知られている。また、マウスの *in vivo* の実験に基づき、当該 rG-CSF を投与することにより、骨髓の造血亢進のみならず、脾臓でも著しい髓外造血が起こり造血幹細胞を始めとしてすべての造血前駆細胞が脾臓で増殖する
- 15 ことが報告されている。係る脾臓での髓外造血のメカニズムとして、rG-CSF の刺激により脾臓の造血微小環境が変化し、造血支持能力が亢進したことにより造血が生じたものであると考えられた。

- そこで、本発明者は、当該脾臓での造血機能を解明するため、rG-CSF 連投後の脾臓の間質細胞に着目し、間質細胞を介した rG-CSF による造血機能
- 20 亢進の解析を試みるべく、rG-CSF を連投したマウス脾臓より造血間質細胞株 (CF-1 細胞) を樹立し、係る造血間質細胞を用いてその造血支持能を検討したところ、*in vitro* でのコロニー刺激活性および *in vivo* での造血幹細胞支持能を認めた [Blood, 80, 1914 (1992)]。

- しかし、当該脾臓間質細胞については、その一部が細胞株 (CF-1 細胞) と
- 25 して樹立され、その細胞学的特性の検討等はなされているが、当該細胞表面抗原を認識する特定の抗体を作製することは全く行われておらず、ましてやその特性

等については未だ全く知られていなかった。

発明の開示

そこで、本発明者は、脾臓間質細胞に関する前記知見と、従来の研究結果を踏まえ、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として鋭意研究し、当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、新規モノクローナル抗体を取得することに成功した。

さらに、前記取得されたモノクローナル抗体の特性について検討し、当該モノクローナル抗体は、骨髓系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するものであることを見出した。以下、当該モノクローナル抗体をBMAP-1抗体と命名し、使用する。

さらに、前記BMAP-1抗体が認識する抗原について検討し、直接発現クローニング(Direct Expression Cloning)により、マウスIntegrin Associated Protein(マウスIAP)(Genbank、Accession Number Z25524)であることを見出した。

さらに、前記BMAP-1抗体の作用を、マウスIAPを遺伝子導入した組み換え体細胞を用いて検討した。すなわち、マウスIAPを発現していないJurkat細胞に、常法によりマウスIAP遺伝子を導入し、マウスIAPを発現する細胞株(Recombinant Jurkat Cell)を作製し、BMAP-1抗体の当該マウスIAP発現細胞に対する作用をMTS法およびフローサイトメトリーによるDNA断片化の検索により検討した(特願平9-67499)。

以上の知見に基づき、ヒトのIntegrin Associated Protein(以下ヒトIAPとする;J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993にアミノ酸配列および塩基配列は記載;Journal of Cell Science、108、3419-3425、199

5) を抗原とするモノクローナル抗体は、当該抗原を発現する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する効果があるとの予想に基づき、本発明者は、ヒト Integrin Associated Protein を抗原としてモノクローナル抗体の作製を試み、当該抗原を有するヒト有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を得ることに成功した。

すなわち、本発明は、ヒトの Integrin Associated Protein（ヒト IAP）を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起させる特性を有する新規モノクローナル抗体およびその断片、更には、当該モノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマを提供することを目的とするものである。

係る新規モノクローナル抗体は、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療薬等として有用である。

さらに、Integrin Associated Protein の機能としては、インテグリンの $\alpha V \beta 3$ の β 鎖に結合し $\alpha V \beta 3$ とそのリガンド (Ligand) であるビトロネクチン (Vitronectin) との結合を支持する作用 (J. Cell. Biol., 123, 485-496 (1993))、好中球と血管内皮との接着に際し血管内皮に Ca^{2+} の流入を誘導する作用 (J. Biol. Chem., 268, 19931-19934 (1993))、あるいは好中球が血管内皮を通過することを支持する作用が報告されているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3978-3982 (1995))、有核血液細胞についてのアポトーシスに関する機能は報告されていない。

すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識する抗体である。従って、ヒト Integrin Associated Protein の識別、及び同定する機能を有するものである。

さらに、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）のアポトーシスを誘起する特性を示す抗体である。ここで、アポトーシス (apoptosis) とは、核クロマチン DNA がヌクレオソーム単位で切断 (いわゆるラダー・フォーメーション) され、その結果、細胞を死に至らしめる現象で、細胞自滅とも云われる現象である。

従来、有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するモノクローナル抗体として知られているものに、抗 Fas 抗体 (Cell, 66, 233-243, 1991)、抗 CD43 抗体 (Blood, 86, 502-511, 1995)、抗 HLA Class I α 1 Domain (Blood, 90, 726-735, 1997) 抗体等があるが、本発明に係る、Integrin Associated Protein を認識する抗体が有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性については全く知られていない。従って、本発明に係るモノクローナル抗体は、Integrin Associated Protein を特異的に認識可能な抗体であり、また、Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起する特性を有するすべてのモノクローナル抗体を包括するものとして定義される。

さらに 本発明に係る抗体は、すべての有核血液細胞にアポトーシスを誘起するもののみに限定されない。少なくとも一種の有核血液細胞にアポトーシスを誘起するものも含まれる。具体的には、骨髓性白血病ならば少なくとも骨髓系細胞にアポトーシスを誘起すればよい。

より詳しくは、本発明は、Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体を提供するものである。

さらに、本発明は、Integrin Associated Protei

n (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物を提供するものである。

5 また、本発明は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

さらに、本発明は、IAPに結合してIAPの作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシスを誘起する物質を含有する抗白血病治療剤を提供するものである。

また、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

10 さらに、本発明は、上記の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、HL-60細胞株のmRNAより作製したcDNAからPCR法で増幅したヒトIAPのバンドを示す電気泳動写真である。左側より分子量マーカー (M)、ヒトIAP (1)、 β アクチン (2) を示す。

15 図2は、ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、対照としてpCOS1のみを遺伝子導入したL1210細胞を示す。

図3は、ヒトIAPを発現させたL1210細胞の抗CD47抗体によるヒトIAPの発現量を示す図である。ピークは、ヒトIAP遺伝子を導入したL1210細胞で明らかにヒトIAPの発現量が増加していることを示す。

20 図4は、免疫マウスでの抗体価を示す図である。左側のピークは、Intact L1210細胞。右側のピークはヒトIAPを発現させたL1210細胞であり、細胞融合に供したマウスの血清は明らかにヒトIAPを認識していることを示す。

25 図5は、ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験 (Jurkat

細胞)を示す図である。

図6は、ハイブリドーマの培養上清を用いての増殖抑制実験(A R H 7 7細胞)を示す図である。

図7は、培養上清によるJ u r k a t細胞に対するアポトーシス誘起作用
5 (P I染色による解析)を示す図であり、対照とした8 G 2の培養上清の場合の結果を示す。R 1はアポトーシスの比率(%)を示し、7.43%である。

図8は、培養上清によるJ u r k a t細胞に対するアポトーシス誘起作用
(P I染色による解析)を示す図であり、7 D 2-E 3の場合の結果を示す。R
1はアポトーシスの比率(%)を示し、9.84%である。

10 図9は、培養上清によるJ u r k a t細胞に対するアポトーシス誘起作用
(P I染色による解析)を示す図であり、1 1 C 8の場合の結果を示す。R 1は
アポトーシスの比率(%)を示し、15.32%である。

図10は、培養上清によるH L-6 0細胞に対するアポトーシス誘起作用
(P I染色による解析)を示す図であり、対照とした8 G 2の培養上清の場合の
15 結果を示す。M 1はアポトーシスの比率(%)を示し、6.94%である。

図11は、培養上清によるH L-6 0細胞に対するアポトーシス誘起作用
(P I染色による解析)を示す図であり、1 1 C 8の場合の結果を示す。M 1は
アポトーシスの比率(%)を示し、12.16%である。

図12 Aは、K M-1 0 2とH L-6 0細胞との共培養系でのアポトーシス
20 の解析(T U N E L法)であり、対照として9 C 5の培養上清を用いた結果を示
す白黒顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色され
る。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図12 Bは、K M-1 0 2とH L-6 0細胞との共培養系でのアポトーシス
の解析(T U N E L法)であり、対照として9 C 5の培養上清を用いた結果を示
25 すカラー顕微鏡写真である。ここで、アポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色さ
れる。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図13Aは、KM-102とHL-60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析 (TUNEL法) であり、11C8の培養上清を用いた結果を示す白黒顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図12より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図13Bは、KM-102とHL-60細胞との共培養系でのアポトーシスの解析 (TUNEL法) であり、11C8の培養上清を用いた結果を示すカラー顕微鏡写真である。TUNEL陽性細胞が図12より多数認められる。ここでアポトーシスの細胞は黒又は褐色に染色される。核染色はメチルグリーンで行い、倍率は100倍である。

図14は、ハイブリドーマ株7D2-E3および11C8より精製されたIgGをSDS・PAGEにより解析した結果を示す電気泳動写真である。分子量マーカー (M、M')、非還元条件でのマウスIgG (標品) (1)、7D2-E3 (2)、11C8 (3)、還元条件でのマウスIgG (標品) (4)、7D2-E3 (5)、11C8 (6) を示す。

図15は、HL-60細胞を用い、CD47の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

図16は、Jurkat細胞を用い、CD47の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

図17は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞 (L1210-hIAP) を用いた (72時間インキュベーション) アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) の結果を示す。

図18は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を用いた (72時間インキュベーション)、MABL-1 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図19は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を用いた (72時間

インキュベーション)、MABL-2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図20は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の結果を示す。

図21は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、MABL-1 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図22は、Jurkat細胞を用いた(48時間インキュベーション)、MABL-2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) のアポトーシス惹起作用を示す。

図23は、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(L1210-hIAP)を用いた(72時間インキュベーション)アポトーシス惹起作用を示すためのコントロールとして、mIgG ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) の結果を示す。

図24は、Fab化したMABL-2 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞に対するアポトーシス惹起作用を示す。

図25は、Fab化したMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を示す。

図26は、MABL-2で処置した場合に生存期間が顕著に延長したことを示す。

図27は、実施例5(2)におけるELISAの結果を示す。

図28は、F(ab')₂化したMABL-2を処置した場合に生存期間が顕著に延長したことを示す。

図29は、F(ab')₂化したMABL-1抗体、及びMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を示す。

図30は、MABL-1およびMABL-2を処置した群において、血中ヒトIgG濃度について見られる顕著な抑制、殺腫瘍効果を示す。

発明を実施するための最良の形態

モノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、一般的には次のようにして作製することができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ヒト Integrin Associated Protein を感作抗原とし、当該抗原を通常公知の免疫法を応用して免疫し、通常公知の細胞融合法を応用して細胞融合させ、
5 通常公知のクローン化法を応用してクローン化することにより可能である。

本発明のモノクローナル抗体の作製方法には、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、ヒト Integrin Associated Protein をマウス白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞に発現させた組み換え体細胞を使用し、当該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）を、マウス等の哺乳動物のミエローマ細胞と融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）をクロー
10 ン化し、その中から前記細胞株を認識する本発明の抗体を産生するクローンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好適なものとして例示される。

なお、本発明においては、上記方法はあくまで一例に過ぎず、例えば、この場合、前記感作抗原としては、前記 L 1 2 1 0 組み換え体細胞に限らず、ヒト Integrin Associated Protein (IAP) そのもの、あるいは可溶化型のヒト IAP を使用することも適宜可能であり、前記 L 1 2 1 0 組み換え体細胞の場合と同様にして、目的とする有核血液細胞（骨髓系細胞およびリンパ球）にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体を作製することが可
15 能である。

また、当該抗体の cDNA ライブラリーからファージ・ディスプレイ法を用いて目的とするモノクローナル抗体を作製することも可能である。

このようなモノクローナル抗体の作製方法において、前記感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエ
25 ローマ細胞との適合性などを考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好適なものとして使用される。

また、免疫は、一般的方法により、例えば、前記ヒト Integrin Associated Protein を発現する L1210 組み換え体細胞等を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することに好ましく実施可能である。より具体的には、PBS や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを、動物に 10 日
5 毎に数回投与することが好ましい。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

次に、前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3X63Ag8.653) [J. Immunol., 123, 1548 (1978)]、P3-U
10 1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)]、Sp2/0-Ag14 [Nature, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]、および R210 [Nature, 277, 131-133 (1979)] 等が好適に使用される。
15

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には通常の方法、例えば、ミルシュタインら (Milstein et al.) の方法 [Methods Enzymol., 73, 3-46 (1981)] 等に準じて行うことができる。
20

より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に、所望により融合
25 効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を適宜添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に

対して、免疫細胞を1～10倍程度とするのが好ましい。また、前記細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、更に、牛胎児血清(FBS)等の血清補液を併用することも可能である。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1,000～6,000程度のPEGを、通常、培地に約30～60%(W/V)の濃度で添加し、混合することによって行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドーマが形成される。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培地、例えば、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地)で培養することにより選択される。当該HAT培地による培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞)が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続する。次いで、通常の限界希釈法に従って、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローン化が実施される。

このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体を採取するには、当該ハイブリドーマを常法に従って培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水から得る方法など適宜の方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

更に、前記した方法により得られる抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニテ

イークロマトグラフィー等の通常の精製手段を応用して高純度に精製することができる。

モノクローナル抗体断片

- 5 本発明に係るモノクローナル抗体は、上記説明した抗体の全部でもまた、その一部であってもよい。すなわち、本発明に係るモノクローナル抗体の一部であって、さらには、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識するものであり、また、ヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）に
- 10 アポトーシスを惹起するものであればよい。係る断片は例えば、Fab、F(ab')₂、Fab' が挙げられる。さらに、係る断片の作製はパパイン、ペプシン、フィシン等の酵素消化により可能である。得られた断片の特性は上記説明した同様の方法で確認可能である。

- 15 モノクローナル抗体と同様の作用を有するペプチドおよび低分子化合物

上記モノクローナル抗体は、ヒト Integrin Associated Protein を認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するが、同様に IAP を認識し、有核血液細胞にアポトーシスを誘起するペプチドおよび低分子化合物も包含するものである。

20

本発明のモノクローナル抗体の特性

本発明のモノクローナル抗体は、後記する実施例において具体的に示されるように、ヒト Integrin Associated Protein を特異的に認識するものである。

- 25 さらに、本発明のモノクローナル抗体はヒト Integrin Associated Protein を有する有核血液細胞（骨髄系細胞およびリンパ球）

にアポトーシスを惹起するものである。

また、係る特性を利用することにより、骨髓性白血病およびリンパ性白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

すなわち、本発明のモノクローナル抗体を利用して有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原等を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するための、あるいは、当該モノクローナル抗体の固有の特性を利用して骨髓性白血病およびリンパ性白血病治療薬剤等として使用するための具体的システムの構築、その改変および応用等は、当業者にとって自明の通常の方法を応用して実施されるものである限り、いずれも本発明の範囲に含まれるものであることは云うまでもない。

抗白血病治療剤

本発明に係る抗白血病治療剤は、IAPの作用が本発明に係る抗体等の結合により亢進することに基づくものである。また、本発明に係る抗体の投与量については特に制限はないが、 $5\mu\text{g}-500\text{mg/kg}$ の範囲であることが好ましい。

実施例

次に、本発明を実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

実施例1 (モノクローナル抗体の作製)

(1) 感作抗原と免疫法

感作抗原として、DBAマウス由来の白血病細胞株L1210細胞(ATCC株番号CCL-219, J. Natl. Cancer Inst. 10:179-192, 1949)にヒトIntegrin Associated Protein (IAP)を高発現した細胞株を用いて抗原感作を行った。

ヒトIAPの遺伝子は、HL-60細胞株のmRNA (CLONTECH社製)より作製したcDNAを鋳型としてヒトIAP特異的な塩基配列を持つプラ

イマー（センス・プライマーとしては、GCAAGCTTATGTGGCCCC
TGGTAGCGを、アンチセンス・プライマーとしては、GCGGCCGCT
CAGTTATTCTAGGAGGを使用した。）を用いたPCRによりヒトI
APを増幅した（図1）。

5 このPCR産物をクローニングベクターpGEM-T vector（プロメ
ガ社製）に組み込み大腸菌JM109（タカラ社製）にトランスフォーメーショ
ンし、Insert DNAの塩基配列をDNAシーケンサー（373A DN
A sequencer, ABI社製）にて確認後、発現ベクターpCOS1に
組み換えた。

10 発現ベクターpCOS1は、pEF-BOS (Nucleic Acids
Research, 18, 5322, 1990) のデリバティブであり、ヒトエ
ロンゲーション・ファクター-1 α をプロモーター/エンハンサーとして使用し
ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクターである。このヒトIAPを組み込
んだ発現ベクターをL1210細胞株にDMRIE-C(GIBCO-BRL社製)を用いて遺
15 伝子導入しGeneticin（最終濃度1mg/ml, GIBCO-BRL社製）により選
択し、さらに、遺伝子が導入されたL1210細胞は限界希釈法により細胞をク
ローニングした。

得られたクローンについて、ヒトIAPを認識する抗CD47抗体（ファーマ
ンジェン社製）で抗原の発現を検討し、発現量の高いクローンを抗原感作の細胞
20 として選択した（図2, 3）。この組み換え体L1210細胞の培養条件は、1
0%牛胎児血清（FBS、Moregate社製）、Iscove改変Dulb
ecco培地（IMDM）（GIBCO-BRL社製）を培地として使用し、
5%CO₂インキュベーター中で37℃の温度条件下で継代培養を行った。

免疫動物としては、L1210細胞と同系マウスであるDBA/2マウス（日
25 本チャールズリバー繁殖）を使用した。抗原感作に使用したヒトIntegri
n Associated Protein (IAP) を遺伝子導入したL12

10細胞は、マイトマイシン-C（協和発酵社製） $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で約30分インキュベーションし細胞の増殖を止めた後、マイトマイシン-Cを完全に洗浄し、PBSに懸濁した。

5 この細胞を約 5×10^6 個の細胞数で約10日前後の間隔で3回上記のマウス腹腔内に注射し免疫した。3回免疫後に眼窩より血液を採取しその血清を1%BSA含有PBSで50倍希釈し、この血清希釈液と抗原感作に用いた組み換え体L1210細胞との結合性をFACSscan（ベクトン・ディッキンソン社製）により確認し（図4）、活性の最も高い個体について、4回目の免疫のさらに5日後に約 1×10^7 個細胞を腹腔内に投与し追加免疫を行った。最終免疫4日後
10 にマウスを屠殺して脾臓を摘出した。

（2）細胞融合

上記のマウスから摘出した脾臓を細切後、遊離した脾細胞を遠沈した後、IMDM培地中に懸濁し、浮遊させ、十分に洗浄を行った。一方、マウス・ミエローマ細胞株P3-U1〔Current Topics in Micro-b
15 iology and Immunology, 81, 1-7 (1978)〕を、10%牛胎児血清（FBS、Moregate社製）を含有するIMDM培地にて培養し、同様に前記IMDM培地で洗浄後、その 1×10^7 個と、前記脾細胞 5×10^7 個とを遠心管に入れ混合し、ポリエチレングリコール4000（半井化学社製）によって常法〔Clin. Exp. Immunol., 4
20 2, 458-462 (1980)〕に従い細胞融合させた。

次いで、得られた融合細胞を、10%FBSおよび融合細胞の増殖刺激剤（BM-Condimed H1、ベーリンガー・マンハイム社製）を含むIMDM培地にて懸濁し96個のウエルプレートに分注し、5%CO₂インキュベーター
25 中で37℃で培養した。翌日にHAT選択培地および増殖刺激剤を含む10%FBS・IMDM培地に置換して培養を継続し、増殖維持させた。

次に、このようにして得られた融合細胞についてその培養上清の機能を白血病

細胞株を用いて検討するため、融合細胞の培地を 10%FBS を含む IMDM 培地に代え、培養を継続し増殖維持させた。

(3) スクリーニング

上記の融合細胞の培養上清を用いて以下のスクリーニングを行った。

5 ① 一次スクリーニング

ヒト Integrin Associated Protein (IAP) の遺伝子を遺伝子導入したマウス脾臓間質細胞株 (CF-1 細胞) (抗原感作に用いたヒト IAP を発現する L1210 細胞を作製する際使用したプラスミドと同一のプラスミドを遺伝子導入し組み換え体細胞とした) を 96 ウェルプレートに 1×10^4 /ウェルで播種し終夜で培養し、その後 2% PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) により固定し ELISA 用プレートを作製した。このプレートは、洗浄後 1% BSA 溶液にて室温で 1 時間ブロッキングし、さらに洗浄後各種ハイブリドーマの培養上清を 50 μ l 添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

15 洗浄後、アルカリフォスファターゼでラベルした抗マウス IgG + A + M (H + L) (ザイメッド社製) を添加し室温で 1 時間インキュベーションし、洗浄後 SIGMA 104 substrate (シグマ社製) を最終濃度 1mg/ml で添加し室温でインキュベーションし、比活性をマイクロプレート・リーダー (Model 3550, バイオラッド社製) で測定した。

20 その結果、ハイブリドーマを 2880 ウェルに播種しその内 2089 ウェルにハイブリドーマの出現を確認し 187 ウェルが一次スクリーニングで陽性であった。なお、陰性対照としては、マウス IgG1 を、陽性対照としては抗ヒト CD47 抗体 (ファーマンジェン社製) をそれぞれ、3 μ g/ml 濃度で 50 μ l 添加し室温で 1 時間インキュベーションした。

② 二次スクリーニング

25 一次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、発現ベクター pCOS1 のみを遺伝子導入した CF-1 細胞を対照として、ヒト Integrin A

ssociated Protein (IAP) を発現する CF-1 細胞を用いての ELISA 系を行うことで、ハイブリドーマが産生する抗体がヒト IAP を特異的に認識するか否かをスクリーニングした。

5 その結果、一次スクリーニングで陽性と認められた 187 ウェルの内 21 ウェルについて陽性が認められた。これらのうち、7D2 および 11C8 を代表例として、ヒト IAP との特異的結合を ELISA の吸高度で表 1 に示した。

(表 1) ハイブリドーマ培養上清のヒト IAP に対する特異的結合の ELISA での解析

=====				
10	<Raw data>	PBS	α hCD47	7D2 11C8
			3 μ g/ml	
	CF1-pCOS1	0.185	0.160	0.189 0.149
	CF1-hIAP-55-8	0.192	0.456	0.568 0.812

15	<Subtracted>	PBS	α hCD47	7D2 11C8
			3 μ g/ml	
	Specific binding	0.007	0.296	0.379 0.663
=====				

20 ③ 三次スクリーニング

二次スクリーニングで陽性と判定したクローンについて、Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞リンフォーマ株) および ARH 77 細胞 (ヒトミエローマ細胞株) を用いて増殖抑制実験を行った。Jurkat 細胞は 5×10^3 /ウェルで、ARH 77 細胞は 1×10^4 /ウェルの細胞数で 96 ウェルプレートに 100 μ l で播種し、この細胞の浮遊液に上記のハイブリドーマ・クローンの培養上清を 5 ないし 10 μ l 添加し、約 2 日間培養後 MTS により細胞数を測定した。対照として

は、10%FBSを含むIMDM培地および一次スクリーニングで陰性であったクローン(8G2および9C5)の培養上清をそれぞれ5または10 μ lずつ添加した。

その結果は、11C8、7D2-E3(7D2のサブ・クローン)、13F1、2F12の4クローンを代表例として増殖抑制効果を図5、6に示した。

5 (4) 抗体の特性

① 11C8、7D2-E3、13F1、2F12の培養上清について、イムノグロブリンのタイプをELISA系を用いて検討した。

すなわち、ヒトIntegrin Associated Protein (IAP)を発現するCF-1細胞を96ウェルプレートに播種しELISAプレートを作製し上記の培養上清を50 μ l添加し、二次抗体としてはアルカリフォスファターゼでラベルした抗マウスIgG抗体(ザイメッド社製)および抗マウスIgM抗体(バイオソース社製)を反応させ、マイクロプレート・リーダーで測定した。その結果、11C8、7D2-E3はIgGであり、13F1、2F12はIgMであった。

15 ② 上記の4クローンの内11C8、7D2-E3の2クローンについて、DNAの断片化をフローサイトメトリー(FACScan, ベクトン・ディッキンソン社製)でJurkat細胞、HL-60細胞を用い解析した。Jurkat細胞を用いては11C8および7D2-E3について、HL-60細胞を用いては11C8について検討した。

20 12ウェルのプレートに、Jurkat細胞およびHL-60細胞をそれぞれ4X10⁴/ウェル/2mlで播種し、7D2-E3および11C8の培養上清を200 μ lを添加し2日間培養後、測定に供した。対照としては、8G2の培養上清を同等量添加した。細胞を培養プレートより回収し200xgで細胞ペレットを2mlの冷70%エタノール中に4℃で60分間固定した。次いで、細胞を遠心し、
25 1mlのPBSで洗浄後、0.5mlのPBSで再懸濁した。この0.5mlの細胞サンプルに対して0.5mlのRNase (Type I-A, Sigma, St. Lo

uis, MO, USA, 1mg/ml in PBS) を加え、次いで、1ml のヨウ化プロビジウム (PI, Sigma, 100 μ g/ml in PBS) 溶液に混合した。混合した細胞は暗所で 37°C で 60 分間インキュベーションした後、4°C の暗所に保持し、フローサイトメトリーによる測定に供した。

- 5 その結果、図 7～9, 10～11 に示す様に、7D2-E3 および 11C8 の培養上清は、Jurkat 細胞に、11C8 の培養上清は HL-60 細胞に対しアポトーシスを起こしている細胞の比率を上昇させることが認められた。

- ③ 上記の 11C8 の培養上清について、ヒト骨髓間質細胞株 KM102 細胞フィーダーレイヤーとして HL-60 細胞との共培養系で、これらの培養上清が HL-60 細胞にアポトーシスを起こすか否かを検討した。

- すなわち、2 ウェルの Lab-Tek Chamber Slide (ナルジエ ムンク インターナショナル社製) に KM102 細胞を播種し sub-confluent の状態にし、この上に 1×10^4 個の HL-60 細胞を播種し約 1 日培養し、その後接着していない HL-60 細胞を除去し同時に上記の培養上清を最終濃度で 10% となるように添加し 2 日間培養した。培養後、細胞を 10% ホルマリンで固定し、TUNEL 法 (ApopTag Plus (Onco r 社製)) によりアポトーシスを起こしている HL-60 細胞を検出した。その結果、図 12, 13 に示す様に 11C8 の培養上清では、対照のヒト IAP と反応しないハイブリドーマクローンの培養上清 9C5 に比べアポトーシスになっている HL-60 細胞の数は増加していることが観察された。

(5) 抗体の精製

- ハイブリドーマが産生する抗体の精製については、上記のハイブリドーマ株のうち、IgG を産生する 7D2-E3 および 11C8 のクローンの細胞株を、常法に従いプリスタン投与を施行した BALB/c/AnNCrj マウス (♂, 日本チャールズリバー社製) に腹腔内注入した。数週間後、産生された腹水を採取し産生される抗体を常法により分離し精製した。すなわち、得られた腹水はポロ

ス プロテインA プラスチックカラム（パーセプティブ・バイオシステム社製）で精製し、PBS（ダルベッコ社製）で透析しSDS-PAGEによりバンドの確認を行った。図14に示すごとく、標品のマウスIgG（カベル社製）を対照として電気泳動を行うと、7D2-E3および11C8のクローンのIgGは、非還元条件、還元条件ともに、標品のマウスIgGと同一の位置にバンドが認められた。

上記の実施例においては、感作抗原として、前記ヒトIntegrin Associated Protein (IAP) を発現するL1210細胞を使用した場合について例示したが、他のヒトIAPを発現する細胞あるいはヒトIAPそのものを使用した場合にも同様にしてモノクローナル抗体を作製すること、さらに、ファージ・ディスプレイ法を用いての抗体ライブラリーからのモノクローナル抗体の作製も可能であり、本発明は前記モノクローナル抗体に限らず、それと同様の特性を有するすべてのモノクローナル抗体、および当該モノクローナル抗体を産生するすべてのハイブリドーマを包含するものである。

さらに、上記のモノクローナル抗体の発明には、ヒト型化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、プライマテイズド抗体、さらに、抗体を各種酵素（パパイン、ペプシン、フィシン等）により消化した抗体の断片を含むものとする。

本発明のモノクローナル抗体の抗ヒトIntegrin Associated Protein (IAP) 抗体を産生するハイブリドーマは、DBA系マウス脾細胞とマウス・ミエローマ細胞株P3-U1を親細胞として作製された新規な融合細胞であり、公的微生物寄託機関である通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、1997年9月11日、抗IAP抗体（マウスハイブリドーマ 11C8-F8（11C8のサブクローン）、MABL-1と命名した）、受託番号FERM BP-6100、抗IAP抗体（マウスハイブリドーマ 7D2-E3（7D2のサブクローン）、MABL-2と命名した）、受託番号FERM-BP-6101として国際寄託

されている。

実施例2 (MABL-1、MABL-2抗体のサブクラス決定)

上で得られたMABL-1、およびMABL-2抗体のサブクラスを決定する
目的で、100ng/mlに調製したMABL-1、およびMABL-2抗体500 μ lを、
5 ISOTYPING KIT(STRATAGENE社製)にスポットしたところ、MABL-1はIg
G1、 κ であり、MABL-2はIgG2a、 κ であることが明らかとなった。

実施例3 (ヒトIAPを発現するヒト白血病細胞)

ヒトIAPを認識する抗CD47抗体(市販品を使用した)で各種ヒト白血病
10 細胞株におけるIAPの発現をフローサイトメトリーで検索した。ヒトIAPは
CD47と同一と考えられていることから(Biochem. J., 304, 525-530, 1994)、
上記の抗体を検索に用いた。細胞株としては、Jurkat細胞、HL-60細胞、
K562細胞、ARH77細胞、Raji細胞、CMK細胞を用いた。細胞
15 は、 2×10^5 /サンプルとし、抗CD47抗体は最終濃度で5 μ g/mlで細胞
とインキュベートし、二次抗体はFITC標識した抗マウスIgG抗体(ペクト
ン・ディッキンソン社製)を使用した。また、コントロールとしてはマウスIg
G1抗体(サイメット社製)を使用した。フローサイトメトリーの結果は、図1
5 (HL-60)及び図16(Jurkat)に示され、いずれの細胞株もIAP
Pを発現していることが明らかとなった。

20

実施例4 (in vitroでのアポトーシス効果)

(1) ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞、Jurkat細胞、HL-
60細胞を用い、MABL-1およびMABL-2抗体のアポトーシス惹起作用
をAnnexin-V(ペーリンガー・マンハイム社製)により検討した。Ann
25 exin-Vによる解析の結果を図17~22にそれぞれ示した。ここで図の左
下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス細胞を、右上の領

域は壊死細胞を示す。抗体は対照としてマウスIgG（サイメット社製）、MABL-1およびMABL-2を10 μ g/mlで使用し、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞では、4 \times 10³個の細胞で72時間、Jurkat細胞では6 \times 10⁴個の細胞で48時間インキュベートした後、Annexin-Vにより解析した。その結果、図17～22に示す通り、細胞死が認められた。また、HL-60細胞では、MABL-1を10 μ g/mlで使用し、1 \times 10⁵個の細胞でAnnexin-Vにより解析し、同様に細胞死が認められた。

(2) Fab化したMABL-2抗体について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞に対するアポトーシス惹起作用を検討した。すなわち、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞を4 \times 10³個で培養し、抗体はFab化したMABL-2およびその対照としてマウスIgGを10 μ g/ml濃度で使用し、72時間インキュベートした後、Annexin-Vで測定した。その結果は、著しい細胞死が認められた（図23，図24）。MABL-2抗体のFab化は、抗体をパパイン（ピアス社製）で消化し精製したものを実験に供した。Fab化したMABL-2抗体については、そのSDS電気泳動により確認した（図25）。

実施例5（in vivoでのアポトーシスの検討）

(1) MABL-1およびMABL-2（Whole IgG）による薬効

ヒトIAPを発現するKPM2細胞（ヒトミエローマ細胞株）をSCIDマウスに移植し、移植後10日目にMABL-1およびMABL-2（Whole IgG）をそれぞれ5 μ g/head、50 μ g/head（n=5）を単回静脈内投与し、KPM2移植後28日目に血中IgG濃度をELISAにて測定した結果、消失したことが確認された。さらに生存期間についても検討した。その結果、MABL-1およびMABL-2を処置した群では、血中ヒトIgG濃度については顕著な抑制が見られ殺腫瘍効果を示した（図30）。さらに生存期間も顕著に延長したことがわかる（図26）。

(2) MALB-1およびMALB-2 (F(ab')₂) による薬効
MALB-1およびMALB-2抗体をペプシンにより消化しプロテインAにより精製(ピアス社製)したF(ab')₂を用い、Fc領域を介した細胞障害作用を除外した殺腫瘍効果を検討した。すなわち、ヒトIAPを発現するKPMM
5 2細胞(ヒトミエローマ細胞株)をSCIDマウスに移植し、F(ab')₂化したMABL-1およびMABL-2の100 μg/head投与群では、移植後6日目、10日目に、10および30 μg/head投与群では投与後6、8、10日目に静脈内投与し、血中IgG濃度を移植後30日目にELISAにて測定した(図27)。さらに、生存期間についても移植後90日まで検討した。その結果、
10 MABL-1およびMABL-2を処置した群では、血中ヒトIgG濃度については顕著な抑制効果が認められ、殺腫瘍効果を示した。さらに生存期間も顕著に延長したことがわかる(図28)。なお、F(ab')₂化したMABL-1抗体、及びMABL-2抗体のSDS電気泳動写真を図29に示す。

産業上の利用可能性

15 本発明のモノクローナル抗体は、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体であり、ヒトIntegrin Associated Proteinを有する有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす抗原である。従って、ヒトIntegrin Associated Proteinを特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するのに有
20 用であると共に、有核血液細胞にアポトーシスを引き起こす作用を有することから、当該特性を利用して、骨髄性白血病およびリンパ系白血病の治療等の分野において有用な治療薬剤等として使用し得るものである。

請求の範囲

1. Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体。
- 5 2. Integrin Associated Protein (IAP) を有する有核血液細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘起するモノクローナル抗体断片、ペプチド、および低分子化合物。
3. 請求項 1 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
4. IAP に結合して IAP の作用を亢進させ、有核血液細胞にアポトーシス
10 を誘起する物質を含有する抗白血病治療剤。
5. 請求項 4 の物質がモノクローナル抗体であることを特徴とする抗白血病治療剤。
6. 請求項 4 の物質がモノクローナル抗体断片、ペプチド、低分子化合物であることを特徴とする抗白血病治療剤。

図 1



図 2

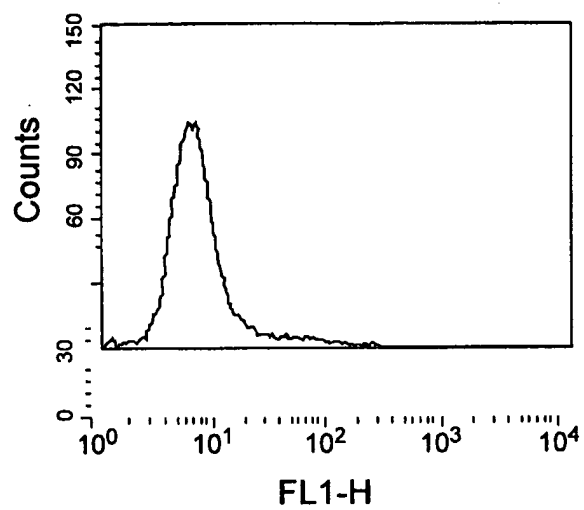


図 3

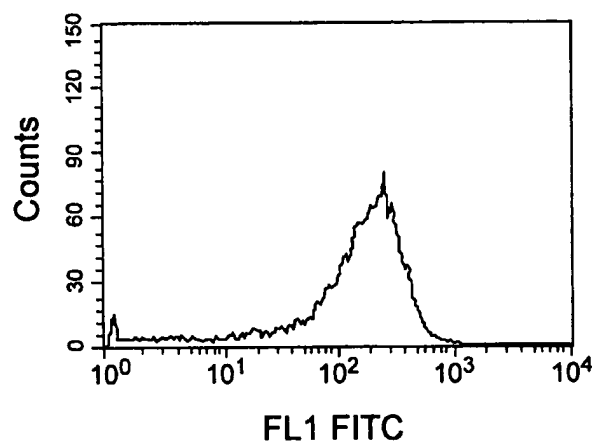


図 4

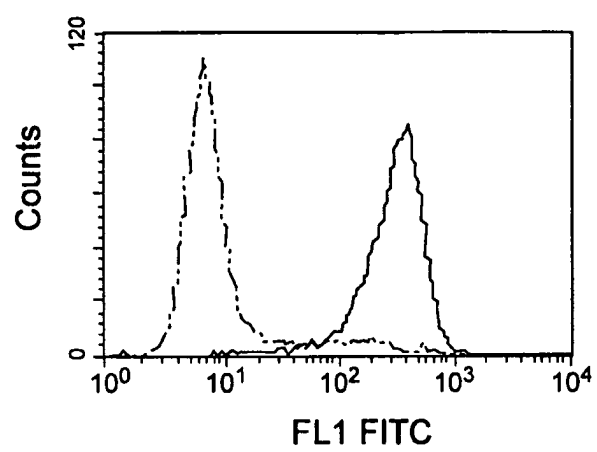


図 5

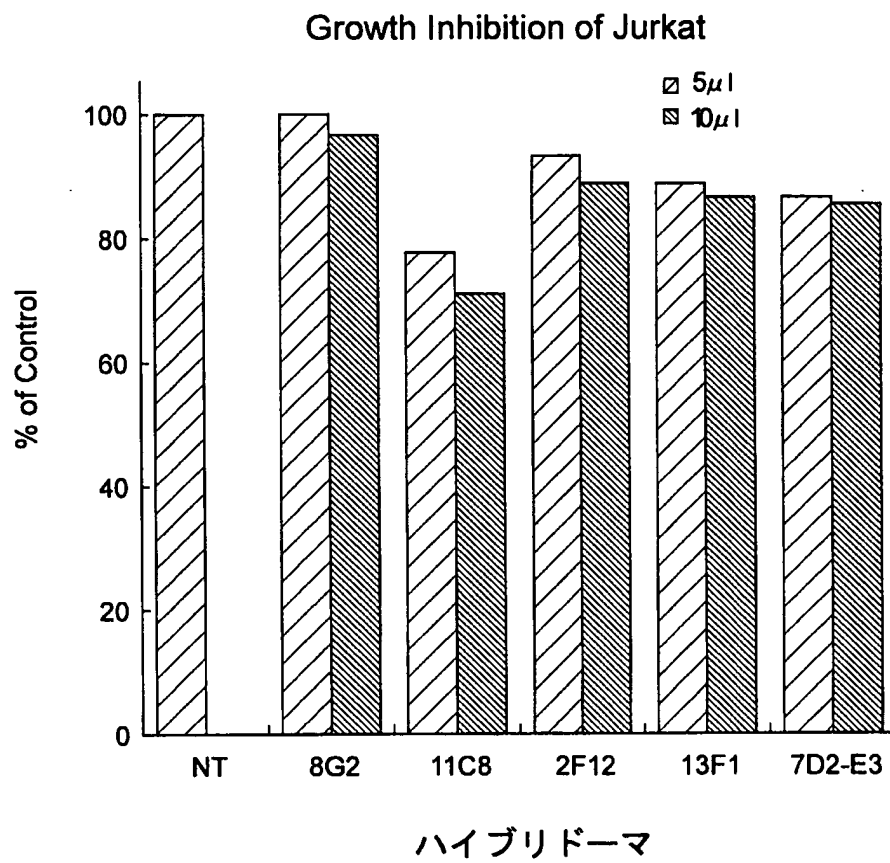


図 6

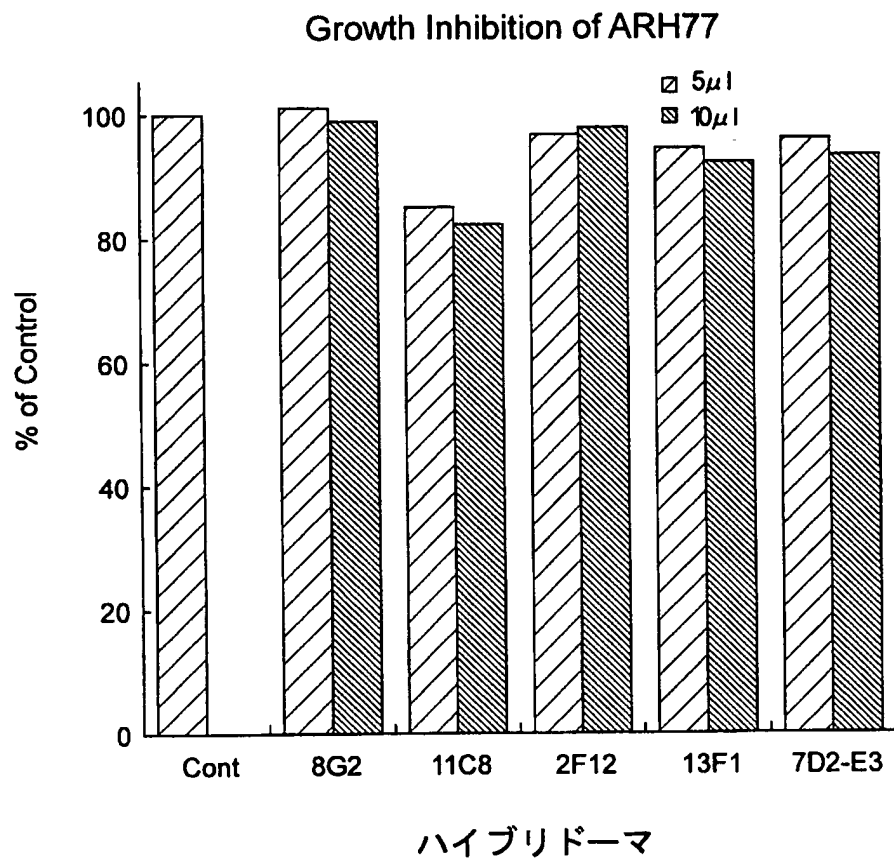


図 7

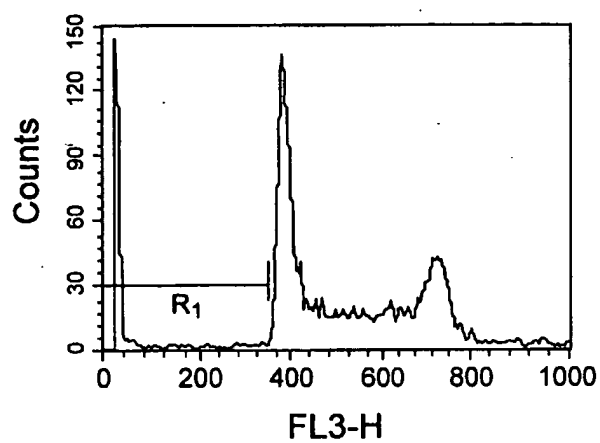


図 8

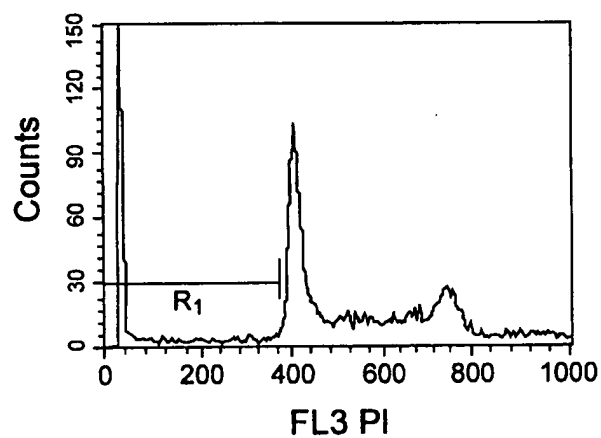


図 9

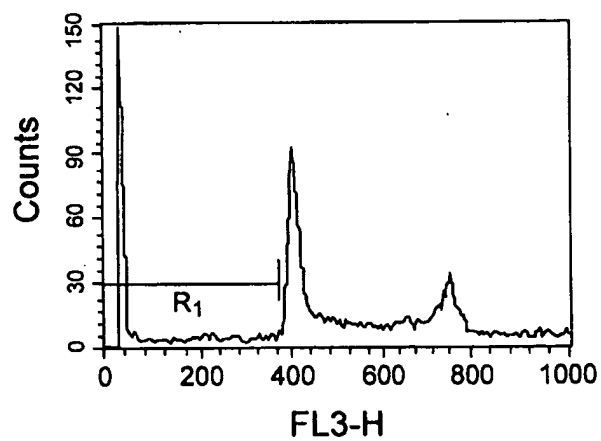


図10

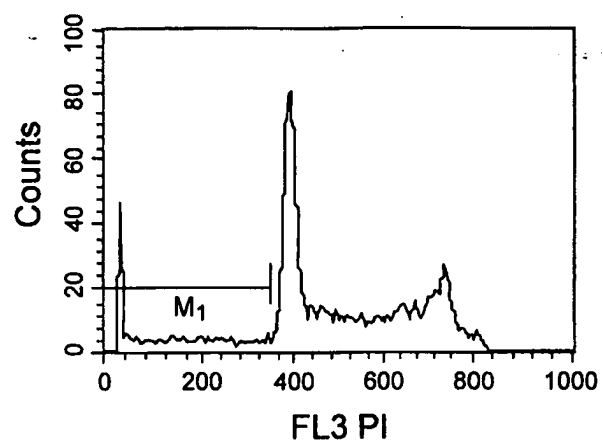


図11

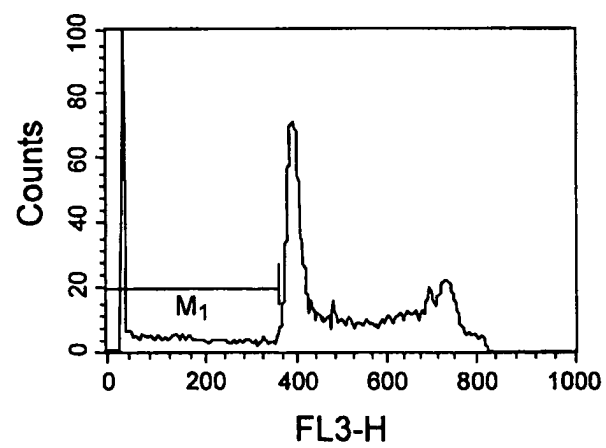


図12A



図12B

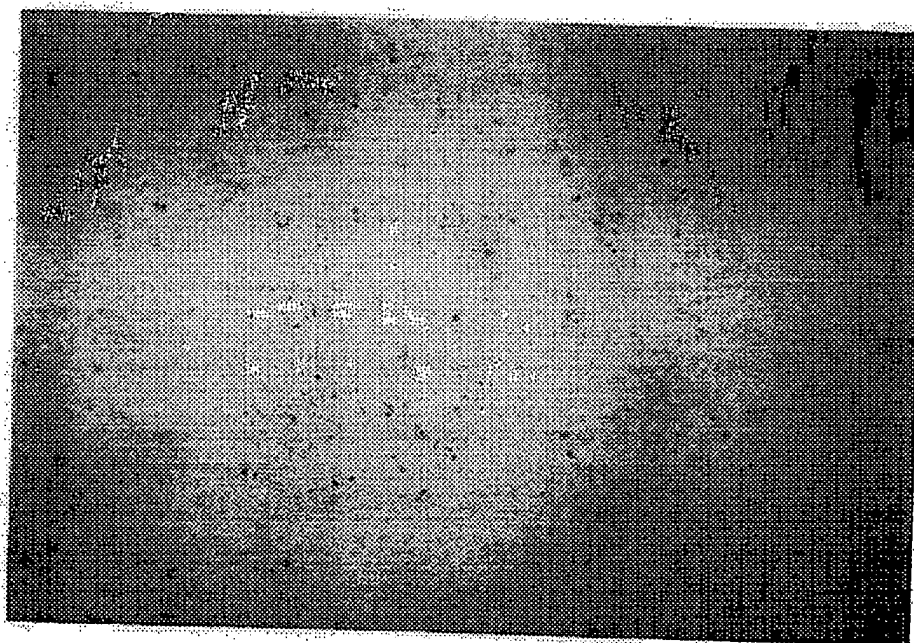


図13A



図13B

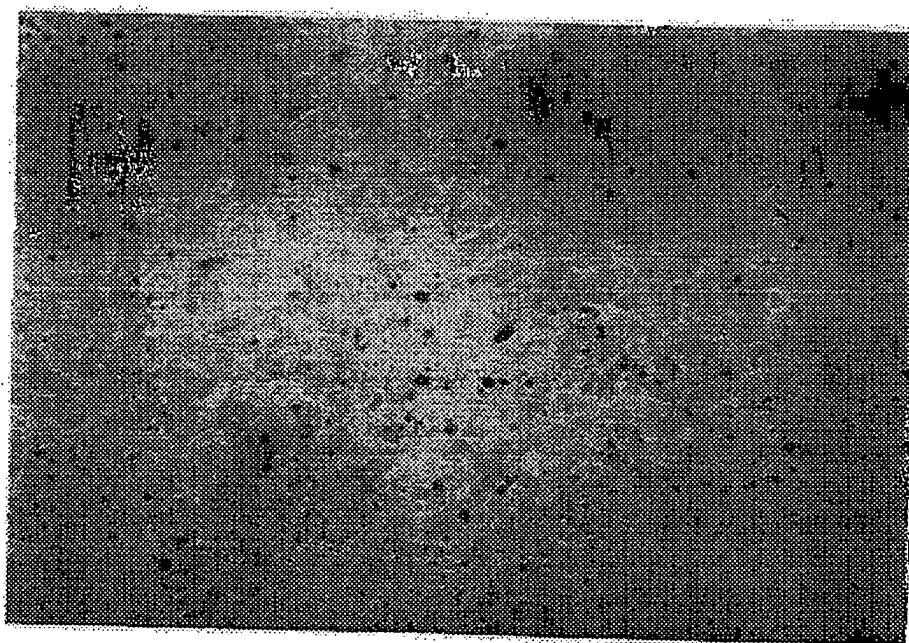


図14

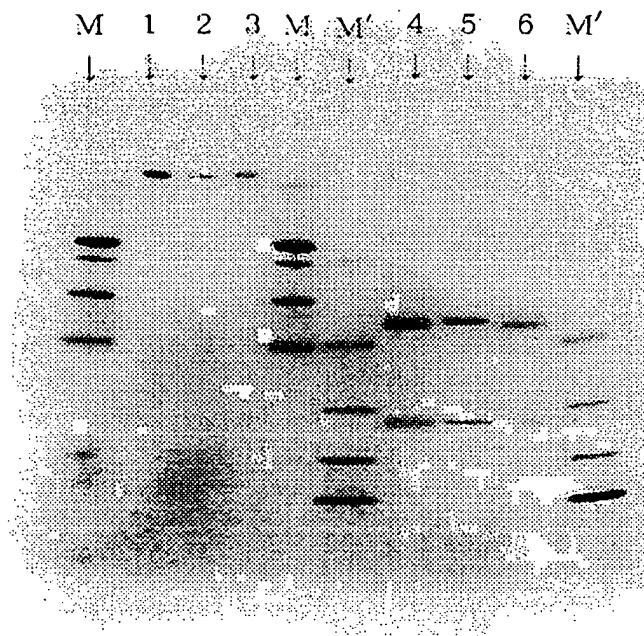


図15

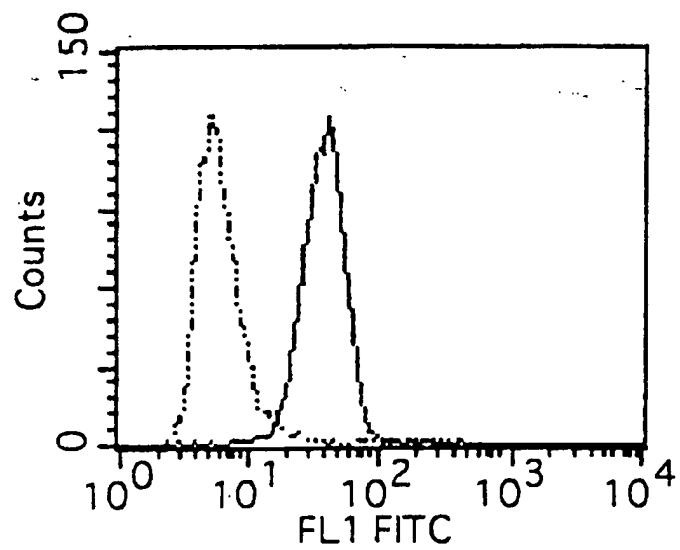


図16

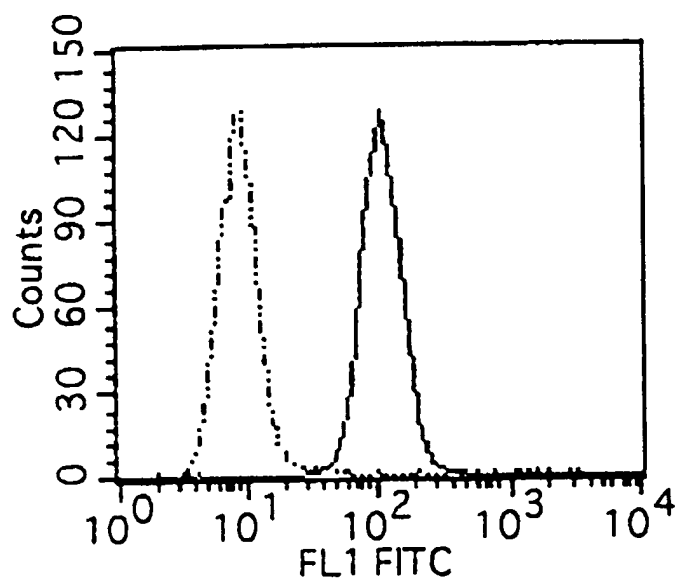


図17

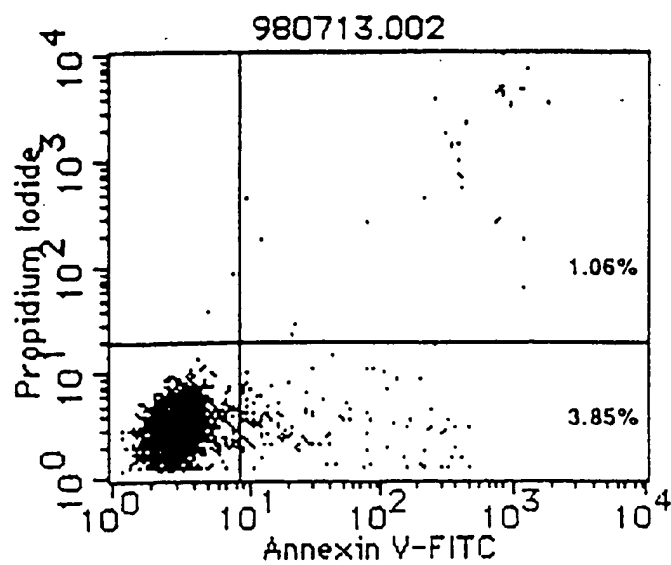


図18

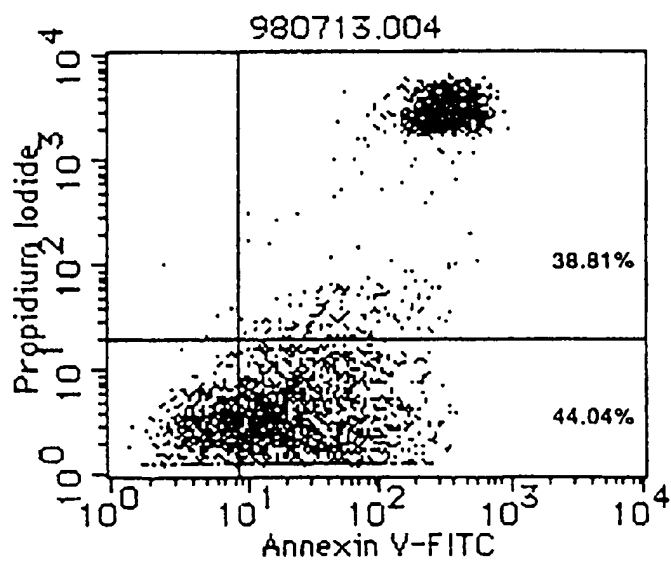


図19

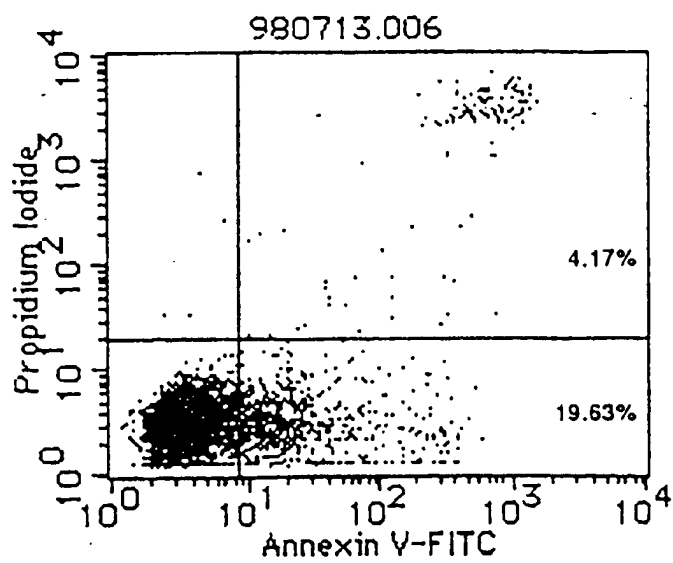


図20

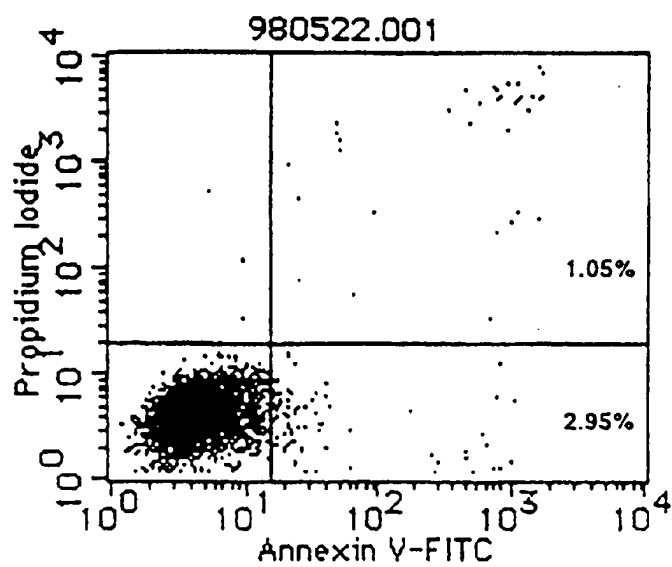


図21

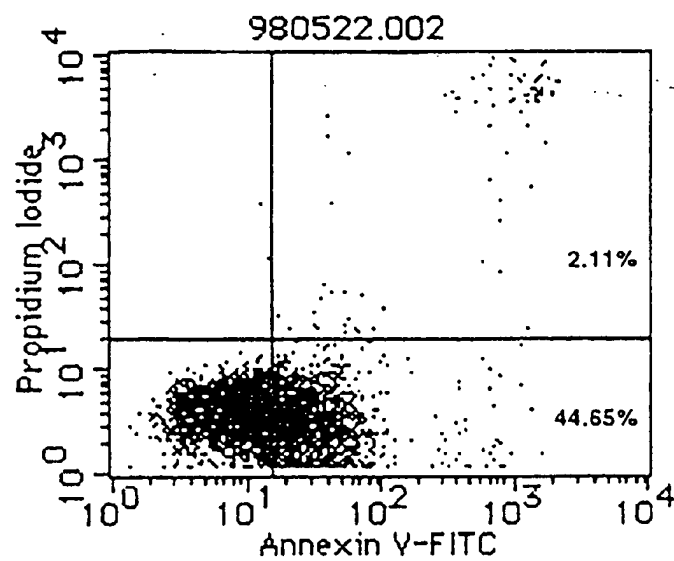


図22

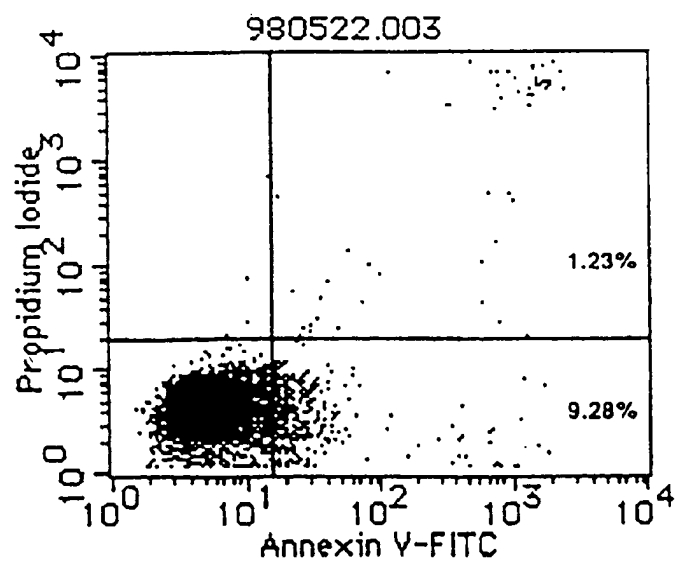


図23

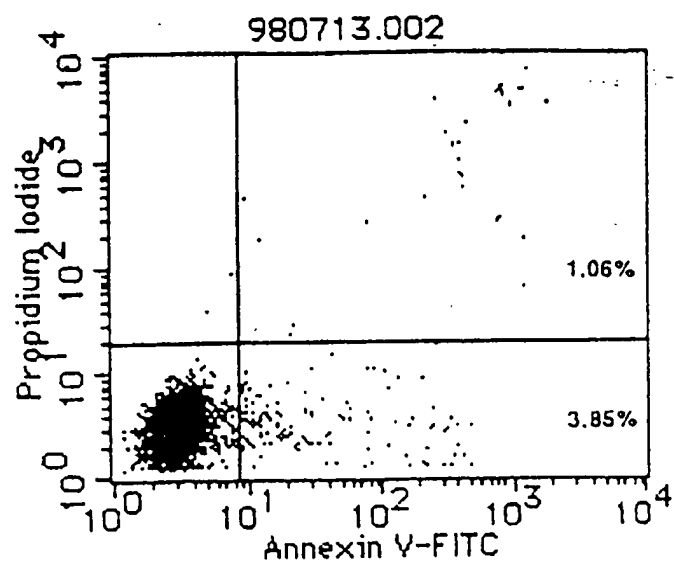


図24

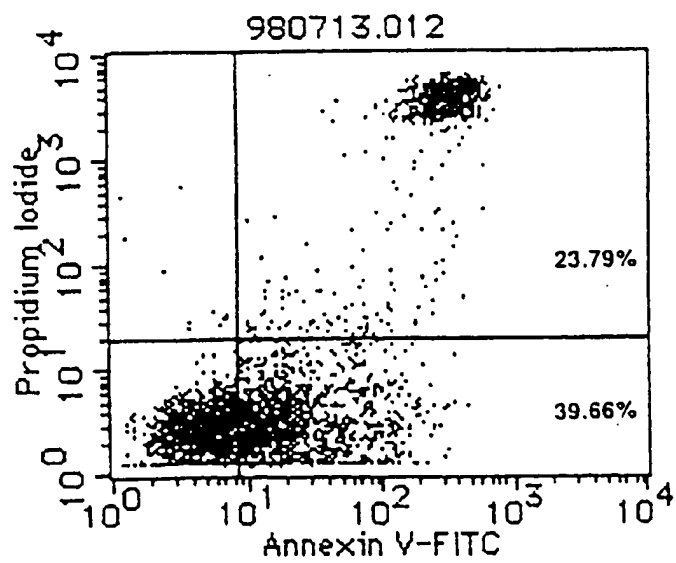
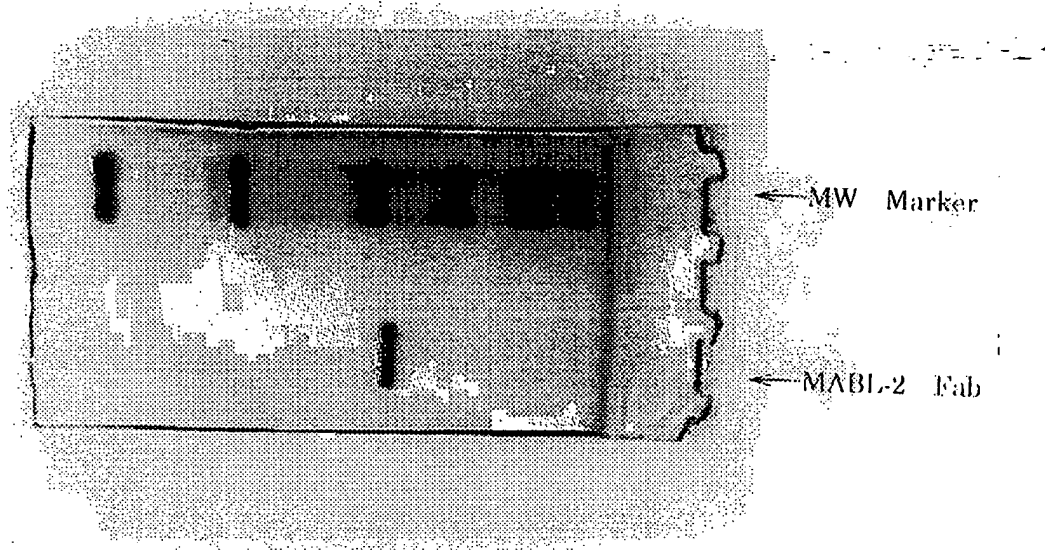


図25



26

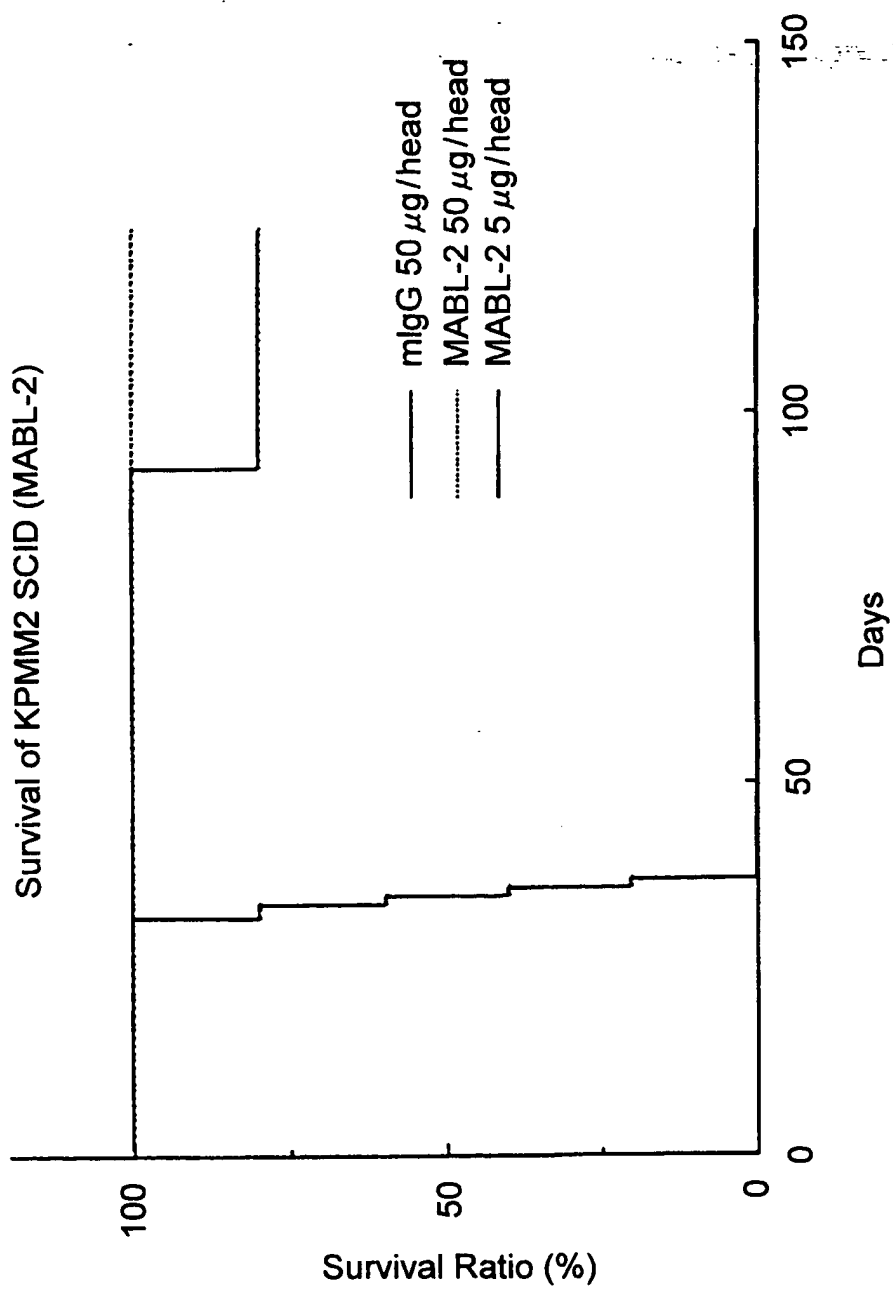
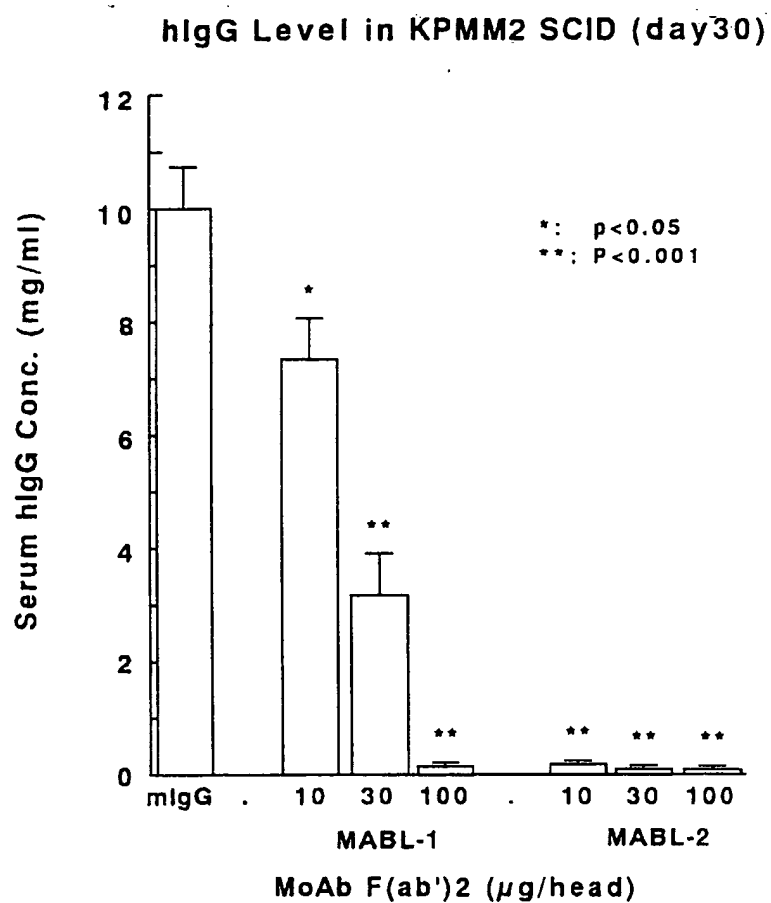


図27



28

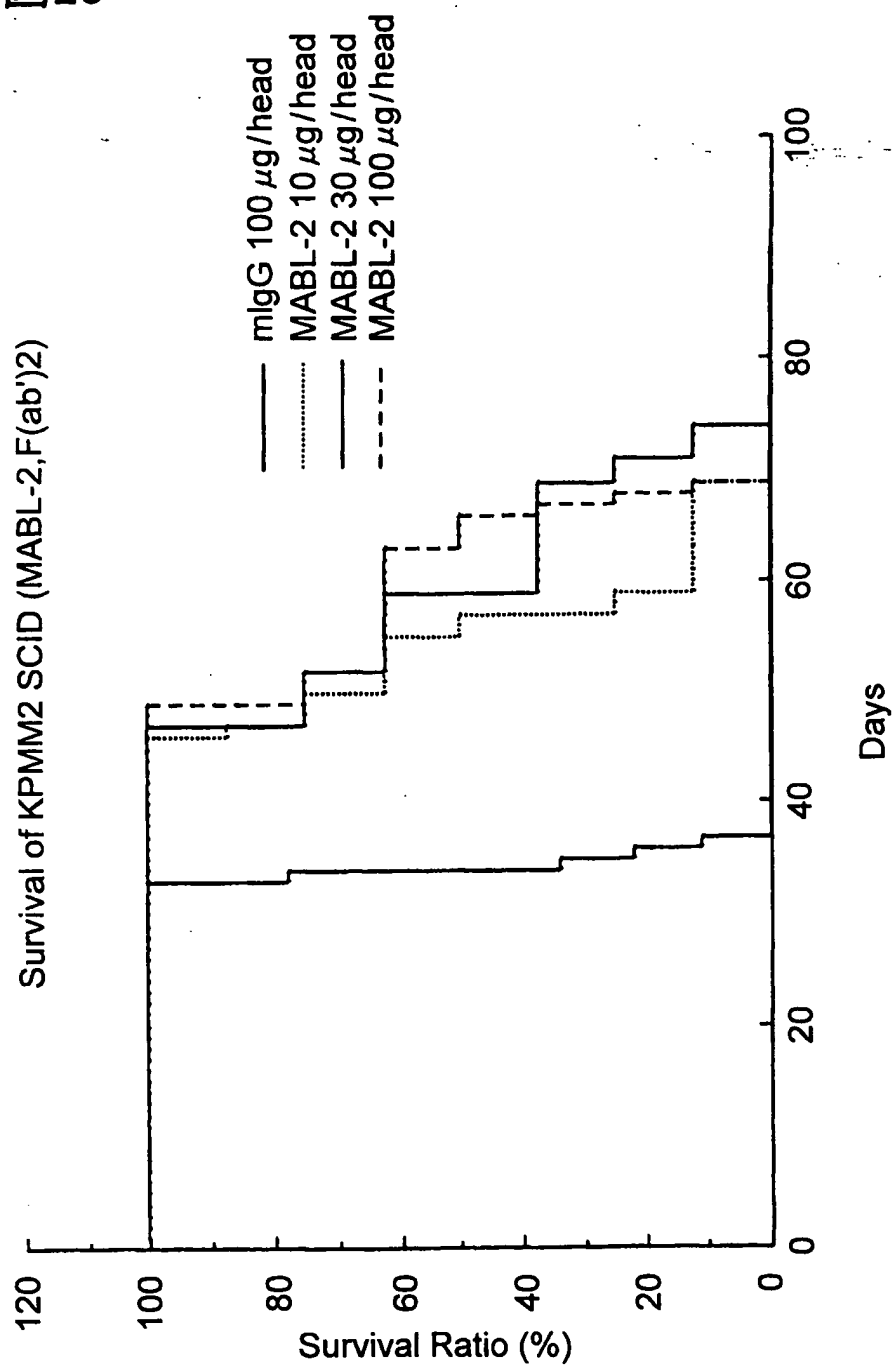
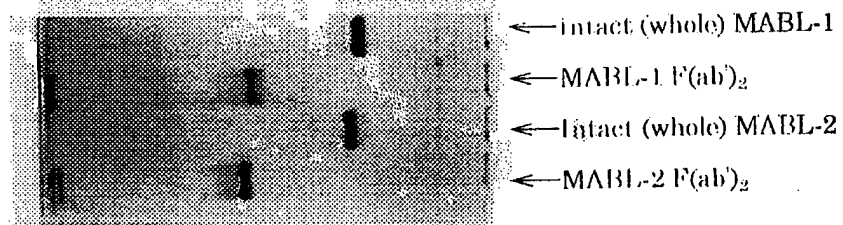
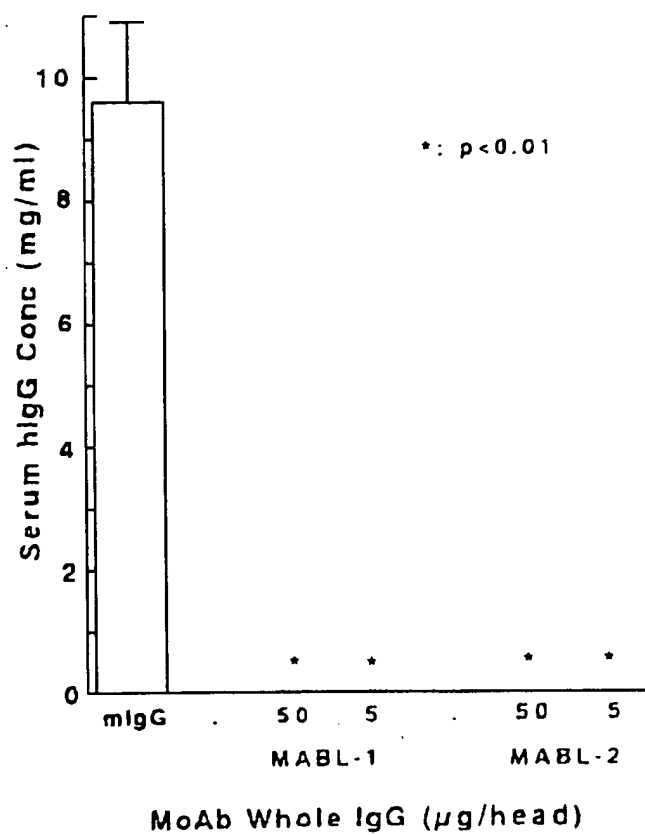


図29



30

hIgG Level in KPMM2 SCID (day 28)



配列表

SEQUENCE LISTING

5 <110>CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120>Monoclonal antibody inducing apoptosis

<130>CGS98-03PCT

10

<160>2

<210>1

<211>26

15

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>PCR primer

20

<400>1

GCAAGCTTAT GTGGCCCCTG GTAGCG 26

<210>2

25

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

5 <230>PCR primer

<400>2

GCGGCCGCTC AGTTATTCCT AGGAGG 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K16/18; C07K16/28, C12N5/20, A61K39/395 // C12P21/08, C12N15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K16/18, C07K16/28, C12N5/20, A61K39/395, C12P21/08, C12N15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 12 September, 1997 (12. 09. 97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1-6
A	Journal of Cell Science vol. 108, No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al., "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 December, 1998 (11. 12. 98)Date of mailing of the international search report
22 December, 1998 (22. 12. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C 07 K 16/18, C 07 K 16/28, C 12 N 5/20, A 61 K 39/395
//C 12 P 21/08, C 12 N 15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C 07 K 16/18, C 07 K 16/28, C 12 N 5/20, A 61 K 39/395,
C 12 P 21/08, C 12 N 15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 97/32601, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 12. 9 月. 1997 (12. 09. 97) & JP, 9-295999, A & AU, 9722325, A	1 - 6
A	Journal of Cell Science vol. 108 No. 11 (1995) Martina I. Reinhold et al. "In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)" p3419-3425	1 - 6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献。

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー三文献

国際調査を完了した日

11. 12. 98

国際調査報告の発送日

22. 12. 98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

Programs and Abstracts from the 26th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (published on November 25, 2003)

p. 660

1PC-166

Construction of an apoptosis-inducing diabody against CD47 that kills leukemic cells

Yasufumi Kikuchi, Shinsuke Uno, Yasuko Kinoshita, Masayoshi Oheda, Naoshi Fukushima, Masayuki Tsuchiya
(Chugai Pharm., Fuji-Gotemba Research Labs.)

We have succeeded in establishing mouse antibody MABL (Monoclonal antibody inducing Apoptosis in Bone marrow Leukemia), which specifically binds to human CD47 antigen and induces apoptosis in human leukemic cells. However, the MABL antibody has a problem of causing agglutination of erythrocytes, because the CD47 antigen is also expressed on the cell membrane of erythrocytes. For this reason, we have studied to construct a MABL antibody that causes no erythrocyte agglutination while retaining its biological activity, by using technologies for smaller antibody design.

As a smaller antibody, we first constructed a single-chain antibody in which V_H and V_L were connected to each other via a 15-mer linker composed of (GGGGS) \times 3. When expressed in CHO cells, this antibody showed apoptosis-inducing activity in leukemic cells *in vitro*. This smaller antibody was found to include not only a monomer, but also a non-covalent dimer (i.e., so-called Diabody). The monomer and dimer were completely separated and purified by gel filtration chromatography, and subjected to various analyses. As a result,

the monomer and dimer were each found to have binding ability to human CD47, but only the dimer showed apoptosis-inducing activity. In fact, the dimer was confirmed to be a divalent antibody (Diabody) with binding ability to human CD 47, as analyzed by BIACORE analysis. More surprisingly, this Diabody was found to cause no erythrocyte agglutination even at high concentrations. On the other hand, the monomer was found to strongly induce apoptosis upon addition of an antibody against the FLAG-peptide used as a tag, thus suggesting that ligation of the CD 47 antigen with a divalent antibody would be required for apoptosis-inducing signaling.

In xenograft experiments in which human myeloma cells were transplanted into mice, the Diabody showed an anti-tumor effect and prolonged the life of the mice. In contrast, the monomer showed little anti-tumor effect.

In view of the foregoing, by using technologies for smaller antibody design, we succeeded in constructing an agonist antibody free from erythrocyte-agglutinating ability. In the future, such technologies will be applicable to various antigens.

第 26 回 日本分子生物学会年会

プログラム・講演要旨集

会 期：2003年12月10日(水)～13日(土)

会 場：神戸ポートアイランド

年会組織委員名簿	ii
第26回年会の開催にあたって	iii
年会参加者へのお知らせ	iv
発表者へのご案内	viii
日程表	x
会場への交通案内	xii
会場案内図	xiii
シンポジウム日程表	xviii
一般演題 口頭発表日程表	xx
一般演題 ポスター発表日程表	xxii
ポスターセッションパネル配置図	xxiv
バイオテクノロジーセミナー日程表	xxvi
年会プログラム	
レクチャー	1
特別企画「バイオリソース」	2
特別企画「組換えDNA実験指針の法制化」に関する説明会	5
特別企画「第2回男女共同参画シンポジウム」	6
日本分子生物学会三菱化学奨励賞	8
シンポジウム	9
一般演題 口頭発表	49
一般演題 ポスター発表	113
バイオテクノロジーセミナー	299
市民公開講座「生き物を分子の言葉で語る」	313
講演要旨	
レクチャー	319
特別企画「バイオリソース」	327
シンポジウム	333
一般演題 口頭発表	421
一般演題 ポスター発表	539
バイオテクノロジーセミナー要旨	1051
人名索引	1089
賛助会員・賛助社芳名	1132
機器・試薬・書籍等展示会出品会社一覧	1134
広告掲載会社一覧	1135
広 告	1136

編集・発行 2003年11月25日

第26回 日本分子生物学会年会 組織委員会

(連絡先) (財)日本学会事務センター大阪事務所 内
〒560-0082 豊中市新千里東町1-4-2
千里ライフサイエンスセンタービル14階
TEL (06) 6873-2301 FAX (06) 6873-2300
<http://edpex104.bcasj.or.jp/mbsj2003/>

ト提抗とら
してしるを
を治用した
ない結高
タで見つ
を回我々
HLA分
ヒトHI
いが
に、日
るHLA
グラム
配列及